

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss transkranieller Hirnstimulation auf die kognitive und motorische Leistung älterer, gesunder Probanden

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sven Paßmann

aus Naumburg / S.

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	4
Abstract	5
1 Einleitung und Zielstellung	6
2 Methodik	8
3 Ergebnisse	9
Studie 1	15
Studie 2	16
Studie 3	18
4 Diskussion	19
Studie 1	19
Studie 2	19
Studie 3	20
Fazit	21
5 Literaturverzeichnis.....	22
Eidesstattliche Versicherung	25
Ausgewählte Publikationen.....	27
Lebenslauf	65
Komplette Publikationsliste	66
Danksagung.....	68

Abkürzungsverzeichnis

Ag/AgCl	Silber-/Silberchlorid
EEG	Elektroenzephalographie
FsSp	engl. fast spindle (schnelle Spindeln im Frequenzbereich 12-15 Hz)
Hz	Hertz (Frequenz-Einheit)
LTP	engl. long term potentiation (Langzeit-Potenzierung)
MD	mittlere Differenz
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MW	Mittelwert
PAS	gepaarte assoziative Stimulation
Sham	Stimulationsbedingung ohne aktiv laufenden Stimulator
so-tDCS	engl. slow oscillatory transcranial direct current stimulation (langsam oszillierende Stimulation in der Frequenz 0,75-1Hz)
SF	Standardfehler
SP	Schlafphase
SWS	engl. slow wave sleep (Tiefschlaf, beinhaltet Schlafphase 3 und 4)
REM	engl. rapid eye movement (Schlafphase am Ende eines Schlafzyklus)
SO	engl. slow oscillation (langsame Gehirnwellen im Frequenzbereich 0,5-1 Hz)
SISp	engl. slow spindle (langsame Spindeln im Frequenzbereich 8-12 Hz)
TMS	transkranielle Magnetstimulation

Zusammenfassung

Einleitung: Transkranielle Hirnstimulation (insb. Magnet- und Gleichstromstimulation; [1]) wird zur Erforschung der Funktion und Arbeitsweise neuronaler Netzwerke und deren Plastizität eingesetzt (z. B. Langzeit-Potenzierung als Grundlage des Lernens, [2]). Mit zunehmendem Alter verändern sich diese Netzwerke, was u.a. mit Einbußen im Gedächtnis in Verbindung gebracht wird [3], wobei auch alternde Gehirne neuronale Plastizität und die Fähigkeit zu lernen zeigen [4]. Auch wenn die Hirnstimulation als vielversprechende Methode zur Modulation altersbedingter oder auch pathologischer Beeinträchtigungen angesehen wird, unterliegt sie bei gesunden Probanden einer hohen Variabilität in der Wirkung [5,6].

Methodik: In *Studie 1* und *2* untersuchten wir den Einfluss eines exogen applizierten oszillierenden Gleichstroms (0,75 Hz) während der Tiefschlafphase auf die Behaltensleistung nach einem 8-stündigen nächtlichen bzw. 90-minütigen nachmittäglichen Schlaf im Vergleich zu einer Sham-Bedingung. Der Einfluss auf die Leistung wurde mittels zweier deklarativer, Hippocampus-abhängiger Gedächtnisaufgaben getestet (nicht-emotionale, semantisch verknüpfte Wortpaare; visuelle-räumliche Bildererkennungsaufgabe) sowie einer prozeduralen Aufgabe als Kontrolle und zusätzlich mittels EEG-Analysen auch auf konsolidierungsrelevante Schlafparameter untersucht (Tiefschlaf, langsam-oszillierende, langsame und schnelle Spindel-Frequenzbänder). Teil dieser Studien war eine gepaarte, assoziative transkranielle Magnetstimulation (TMS-PAS) zur Erfassung plastizitätsähnlicher Prozesse im motorischen System. Deren Ergebnisse wurden in *Studie 3* in Form einer Meta-Analyse mit 7 weiteren Studien auf die Robustheit der Methode und des Einflusses verschiedener Stimulationsparameter (Alter, Geschlecht, statistische Methode) geprüft.

Ergebnisse: Wenn auch in *Studie 1* und *2* der unmittelbare Einfluss der Stimulation auf neurophysiologische Parameter positiv war und die Aktivität gedächtnisrelevanter Hirnaktivität modulierte, zeigte sich hinsichtlich der Gedächtnisleistung in der visuell-räumlichen Aufgabe ein deutlicher Unterschied zwischen den Studien. In *Studie 1* kam es zu einer Verschlechterung in der Bildererkennungsleistung. Hier könnten die vermehrt aufgetretenen Wachphasen und der reduzierte Tiefschlaf unter Stimulationsbedingung ursächlich sein. In *Studie 2* hingegen kam es – vermutlich aufgrund der fehlenden Störung des Schlafes durch die Stimulation, wie in Studie 1 – zu einer Verbesserung. Keine Unterschiede wurden hinsichtlich der Wortpaar-Aufgabe und der prozeduralen Aufgabe gefunden. In *Studie 3* konnte hinsichtlich des TMS-PAS Protokolls kein

Einfluss der TMS auf die motorische Leistung – gemessen an den motorisch evozierten Potentialen - gefunden werden. Entscheidend für die richtige Interpretation der Ergebnisse ist allerdings die Wahl der statistischen Methode (log-Transformation rechtsschief verteilter Daten wird empfohlen).

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Hirnstimulation durchaus positiv auf Nervenzellen wirken kann, doch ist eine Verbesserung damit erwarteter kognitiver oder motorischer Leistung aufgrund oftmals beobachteter hoher Variabilität in Abhängigkeit spezifischer Gruppenmerkmale nicht immer gegeben. Der Fokus zukünftiger Forschung sollte daher auf die spezifische Anpassung entsprechender Protokolle liegen.

Abstract

Introduction: Since researchers found that transcranial brain stimulation (magnetic and direct current stimulation) [1] have an impact on neurons, such methods were used to investigate the function and operation of neuronal networks and its plasticity (long-term potentiation as the basic principle of learning [2]). During ageing those networks are changing which were discussed as related to impairments in memory [3], but in an ageing brain neuronal plasticity and the ability to learn were also found [4]. Even if brain stimulation seems to be a promising tool to modulate age- or pathological-related impairments, there is a great variability in effectiveness in healthy subjects [5,6].

Methods: In *study 1* and *2* we explored the impact of a direct current (0.75 Hz) during the slow wave sleep phase on retention performance after 8 h of nocturnal sleep and 90 min of daytime nap compared to Sham-condition. We tested the impact on the performance with two declarative, hippocampal-dependent tasks (non-emotional, semantic-related wordpairs; visual-spatial picture recognition) as well as a procedural task as control and additionally, on consolidation-related sleep-parameters (slow wave sleep, slow oscillating, slow and fast spindle activity) by courtesy of EEG-analyses. A paired associative transcranial magnetic stimulation (TMS-PAS) was part of both studies to survey neuronal plasticity in motoric nerv pathways. In *study 3* we examine the robustness of this method and the impact of several stimulation parameters (i.e., age, gender, statistical method) in a meta-analysis altogether with 7 other studies.

Results: In *study 1* and *2* we found a general positive impact of stimulation on memory-related brain activity, but a difference between both concerning retention performances in the visual-spatial task. In *study 1* the picture recognition performance was decreased which we discuss as a result of increased wake times and less slow wave sleep under stimulation condition. Contrary,

in *study 2* we found an increase in picture recognition performance presumably due to the missing impact of stimulation on sleep habits. We found no differences concerning wordpair task, retention of location and procedural task. Additionally, no effect of TMS-PAS intervention was revealed, but we could show that the choice of the statistical method has an immanent influence on the results.

Conclusion: Our results could show that transcranial brain stimulation quite show a positive impact on neurons. But an expected increment of performance is not always granted due to high variability dependent from specific group characteristics. Therefore, the focus of future studies should be on adaptations of relevant protocols.

1 Einleitung

Schlaf und Gedächtnis sind eng miteinander verknüpft. Bisherige Studien zeigten, dass der menschliche Tiefschlaf (engl. slow wave sleep, SWS; Schlafphase 3 und 4 nach Rechtschaffen und Kales [7]) in der Übertragung und Integration Hippocampus-abhängiger Inhalte in das Langzeitgedächtnis von entscheidender Bedeutung ist (siehe Review [8]). Dabei zeigen bereits 1 – 2 Stunden Schlaf einen förderlichen Effekt auf die Gedächtniskonsolidierung [9,10].

Als neurophysiologischer Mechanismus für den konsolidierungsförderlichen Effekt im Schlaf wird ein zeitlich koordiniertes Zusammenspiel von drei verschiedenen Gehirnwellenmustern während des Tiefschlafs postuliert [11,12]. Taktgeber sind langsame Gehirnwellen (engl. slow oscillation, SO), welche frontal generiert werden und aus depolarisierenden „Up“-Phasen und hyperpolarisierenden „Down“-Phasen bestehen. Dabei synchronisieren die SO höherfrequente kortiko-thalamische Schlafspindeln und hippocampale *sharp wave ripples* (während des Schlafes auftretende, spontane Reaktivierungen von am Tage abgespeicherten Gedächtnismustern) in die SO „Up“-Phasen [13,14]. Während der Spindel-Aktivität (hoch repetitive, neuronale Entladungen von begrenzter Dauer, 0,5-3 s mit einer Frequenz von 8-12 Hz) kommt es zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Nervenzelle, welcher zelluläre Mechanismen neuronaler Plastizität initiiert und Prozesse unterstützt (synaptischer Homöostase, synaptischer Plastizität und Genexpression), die den Neokortex optimal auf die Integration und Langzeitspeicherung der reaktivierten Gedächtnismuster vorbereiten soll[15].

Plastizitätsprozesse sind nicht nur bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen und deren Restitution von fundamentaler Bedeutung, sondern auch bei der Wiederherstellung bzw. Stärkung neuronaler Verbindungen im Rahmen verbliebener Möglichkeiten hinsichtlich des

normalen Alterungsprozesses. Experimentell kann neuronale Plastizität beim Menschen durch verschiedene nicht-invasive Hirnstimulationsverfahren induziert werden. Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung spezifischer Hirnrhythmen und damit assoziierter Prozesse durch exogene Stimulation (tDCS; engl. transcranial direct current stimulation). Eine weitere Form der synaptischen Plastizität, die im Rahmen von Lernen und Gedächtnis relevant ist, ist die über den Glutamat Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat, NMDA) vermittelte Langzeit-Potenzierung (engl. long term potentiation, LTP; [2]), die mithilfe der transkraniellen Magnetstimulation [16–18] untersucht werden kann.

(1) tDCS ist eine seit einiger Zeit verwendete Methode zur Beeinflussung des Tiefschlafs und damit verbundener konsolidierungsrelevanter Prozesse [19,20]. Exogen applizierte langsam oszillierende Ströme (engl. slow oscillating tDCS, so-tDCS; 0,75 Hz) sollen kortikale SO-Aktivität derartig beeinflussen, das damit verknüpfte kortikale Prozesse ebenfalls positiv beeinflusst werden könnten. Die Forschungsgruppe um Marshall konnte mit dieser Methode eine Verbesserung der Gedächtnisleistung in einer Wort-Paar-Lernaufgabe über Nacht bei jungen Probanden zeigen, inklusive der Zunahme frontaler SO und SWS [19,21]. Die bisherigen Erkenntnisse blieben aber bisher auf das verbale Gedächtnis beschränkt und sind bei älteren, gesunden Probanden widersprüchlich [22,23], was u.a. mit einer fehlenden Anpassung des Protokolls an den veränderten nächtlichen Schlaf älterer Menschen erklärt werden kann [3].

(2) Plastizitäts-ähnliche Effekte im motorischen System können z.B. mit Hilfe der transkraniellen Magnetstimulation untersucht werden [16–18]. Durch eine gepaarte assoziative Stimulation (engl. paired associative stimulation, PAS; [24]) werden LTP-ähnliche Mechanismen (Stimulus-Zeit-Abhängigkeit [17], NMDA-Rezeptor-Abhängigkeit [25] und Assoziativität [16]) zur Bahnung (Aufbau und Verstärkung) neuronaler Verbindungen in Gang gesetzt, welche sich z.B. in einer verbesserten motorischen Reaktion widerspiegelt (gemessen über motorisch evozierte Potentiale, MEP) [16]. Trotz eines kürzlich erschienenen Reviews zur positiven Wirkung der PAS-Methode, unterliegen die Ergebnisse hohen inter- und intraindividuellen Schwankungen [6,26], welche auf verschiedene Einflüsse wie Alter [6], Tageszeit [27], Methode zur Bestimmung des idealen Stimulationsortes zur Auslösung des MEP [28] oder die Wahl der statistischen Analyse zurückzuführen sind.

Die mit zunehmenden Alter auftretenden kortikalen Veränderungen sind eine mögliche Ursache für altersbedingte kognitive Veränderungen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden anhand von 3 Studien kortikale Plastizitätsprozesse mittels eines oszillierenden Gleichstroms (Studie 1, 2) bzw. einer gepaarten assoziativen Stimulation durch TMS (Studie 3) experimentell moduliert und deren Auswirkungen auf kognitive und motorische Leistung bei gesunden Älteren erfasst. Die Ergebnisse der Studien können helfen, die Effektivität plastizitätsbasierter Therapien valide zu erfassen und zu verbessern und weitere spezifische bzw. individuell angepasste Interventionsansätze zu entwickeln, um altersbedingten kognitiven Veränderungen entgegen wirken zu können.

2 Zielstellungen

In *Studie 1* wurde in einem Crossover-Einzelverblindungs-Design der Einfluss eines exogenen, langsam oszillierenden Gleichstroms (0,75 Hz) während der ersten nächtlichen Tiefschlafphase auf die Behaltensleistung in zwei deklarativen, Hippocampus-abhängigen Gedächtnisaufgaben (visuell-räumlich, Wortpaare) und in einer prozeduralen Aufgabe (als Kontrolle) bei älteren, gesunden Probanden untersucht. Ziel war es zu prüfen, ob (i) die für nächtliche Gedächtniskonsolidierung wichtigen SO auch bei älteren gesunden Probanden moduliert (verbessert) werden können und (ii) die Behaltensleistung in einer visuell-räumlichen Aufgabe verbessert wird. Zum Vergleich mit anderen Studien wurde zusätzlich noch eine Wortpaar-Aufgabe sowie eine prozedurale Aufgabe als Kontrolle präsentiert.

Studie 2 entspricht im Wesentlichen der *Studie 1*, die Stimulation erfolgte jedoch während eines 90 min Nachmittagsschlafes. Ziel war es auch hier, einen förderlichen Effekt der Stimulation auf die Gedächtniskonsolidierung in einer visuell-räumlichen Aufgabe während eines Schlafes am Nachmittag zu untersuchen. Bisher gibt es nur wenige Befunde, die – wie im Nachtschlaf - auf das verbale Gedächtnis beschränkt sind.

Studie 3 hatte zum Ziel, die Wirksamkeit neuromodulatorischer Effekte des PAS-Protokolls bei gesunden älteren Probanden zu untersuchen. Dazu wurden Daten aus 9 verschiedenen Studien von drei Arbeitsgruppen (siehe Publikation; inklusive bisher unveröffentlichter Daten aus den *Studien 1* und 2) zusammengeführt und einheitlich ausgewertet, um speziell die Bedeutung des statistischen Auswertungsverfahrens bei der Interpretation der Ergebnisse zu diskutieren.

3 Methodik

3.1 Studienteilnehmer

Für *Studie 1* und *2* wurden gesunde, ältere Menschen im Alter zwischen 50 und 80 über eine lokale Datenbank der Charité Universitätsmedizin, Berlin rekrutiert und per Telefoninterview auf generelle Eignung geprüft. Ausschlusskriterien waren unbehandelte medizinische, neurologische und/oder psychiatrische Erkrankungen, Schlafstörungen, generelle Nichteignung für Magnetresonanz-Tomographie (MRT), Einnahme von zentralnervös wirkender Medikamenten bzw. keine deutschen Muttersprachler, täglicher Konsum von > 50 g Alkohol. Die geeigneten Probanden wurden medizinisch/neurologisch begutachtet (MRT, kognitive Beeinträchtigungen, psychische Erkrankungen) und ihre allgemeine kognitive Leistungsfähigkeit anhand umfangreicher neuropsychologischer Tests erfasst, um derartige Leistungen unterhalb der Alters- und Bildungsnorm bzw. erhöhte Depressions- oder Angstneigung auszuschließen, bevor sie an den experimentellen Nächten im Schlaflabor teilnehmen konnten. Posthoc führten technische Schwierigkeiten, Artefakte im EEG-Signal oder > 50% fehlender Reaktionen bei der visuell-räumlichen Aufgabe zum Ausschluss von Probanden, so dass 21 Probanden der *Studie 1* (10 Frauen, Altersdurchschnitt 65 ± 1) bzw. 18 Probanden der *Studie 2* (10 Frauen, Altersdurchschnitt 65 ± 1) eingeschlossen wurden. Für *Studie 3* wurden 190 Probanden aus 9 Studien von drei verschiedenen Forschungsgruppen eingeschlossen (20 Probanden aus *Studie 1*, 7 Frauen, MW Alter: 65 ± 5 ; 15 Probanden aus *Studie 2*, 7 Frauen, MW Alter: 64 ± 6 bzw.). Für alle Teilnehmer gilt, dass sie mündlich und schriftlich über Inhalt und Ziel dieser Studien aufgeklärt wurden. Die Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis und erhielten zum Abschluss eine angemessene Aufwandsentschädigung. Alle Studien wurden von der jeweils örtlichen Ethikkommission genehmigt und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.2 Studiendesign

Die *Studie 1* und *2* gliederten sich jeweils in Baselinetestung und Hauptuntersuchung. Die Baselinetestung (Ergebnisse werden nicht berichtet) beinhaltete das PAS – Protokoll und standardisierte neuropsychologische Gedächtnis-Tests zur Erfassung des kognitiven Status (Auditory Verbal Learning Tests [29], Arbeitsgedächtnis [30], Exekutivfunktionen (Stroop-Color-Word Test [31]; Trail Making Test, Teil A und B [32]); Alters-Konzentrations-Test [33]). Der aktuelle affektive Zustand wurde mit Hilfe der Positive And Negative Affective Schedule (PANAS, [34]) erfasst und das subjektive habituelle Schlafverhalten mittels verschiedener

standardisierter Schlafragebögen (Pittsburgh Schlafqualitäts-Index [35]; Epworth Schläfrigkeitsskala [36]; deutsche Version des Morningness-Eveningness-Questionnaire [37]; Essener Fragebogen Alter- und Schläfrigkeit [38]) und einem einwöchigen Schlaf-Wach-Protokoll erhoben. Zusätzlich wurde zur objektiven Erfassung des Aktivitätsniveaus für mindestens eine Woche ein Aktigraf getragen (GT3X, ActiGraph, Pensacola, FL, USA).

Die Hauptuntersuchung fand im Schlaflabor statt. Nach einem Eingewöhnungstermin (Tragen der Elektroden während des Schlafens, Kurzform der behavioralen Aufgaben zur Einübung), verbrachten die Probanden zwei weitere Experimentalnächte im Schlaflabor (Abstand 2-3 Wochen) entweder unter so-tDCS- oder Sham-Bedingung (Schein-Stimulation; randomisierte Reihenfolge). Vor und nach dem Schlaf wurde das generelle Befindlichkeits- und Aufmerksamkeitslevel abgefragt (Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung, TAP [39]; Visual Analogue Scale, VAS müde/entspannt [40], Müdigkeits-Symptom-Skala, TSS [41], PANAS). Nach dem Anlegen der Elektroden wurden die Gedächtnisaufgaben durchgeführt: Erlernen und der Abruf der Items zweier deklarativer Gedächtnis-Aufgaben (visuell-räumliche Aufgabe, Wortpaar-Aufgabe) sowie das Nachtippen einer Zahlensequenz (prozedurales Gedächtnis als Kontrolle: Fingertapping-Sequenz-Aufgabe), der sich mind. 8 h (*Studie 1*) bzw. 90 min (*Studie 2*) Schlaf mit EEG-Aufzeichnung anschloss. Frühestens 20 min nach dem Wecken erfolgte der verzögerte Abruf aller drei Aufgaben.

3.3 Langsam oszillierende Stimulation (engl. *slow-oscillating tDCS*, so-tDCS)

In der so-tDCS-Bedingung floss ein anodaler Strom aus einem Batterie-betriebenen Stimulator (NeuroConn Ilmenau, Deutschland), oszillierend (zwischen 0 und 260 μA) mit einer Frequenz von 0,75 Hz und einer maximalen Stromdichte von 0,522 mA/cm^2 über 2x2 Ag/AgCl-Elektroden (bilateral: anodal an Position F3/F4 nach internationalem 10-20-EEG-System; Referenzen: zwei ipsilaterale, mastoide Kathoden; Widerstand: $< 5 \text{ k}\Omega$). Angelehnt an das Protokoll von Marshall und Kollegen [21] wurde 4 Minuten nach Erreichen der stabilen Schlafphase 2 (keine erneute Rückkehr in Schlafphase 1) mit der Stimulation von maximal 5 Stimulationsblöcken für je 5 min, unterbrochen durch stimulations-freie Intervalle (für Analysen) von mind. 1 min Dauer begonnen, wobei die Applikation der folgenden Stimulationsblöcke adaptiv unter online Kontrolle der aktuellen Schlafphase erfolgte (Proband musste mind. in Schlafphase 2 sein, andernfalls wurde bis zum Erreichen derselben gewartet). Diese Prozedur war eine Anpassung an das bisherige Protokoll von Marshall und Kollegen [42], um der erhöhten Schlaffragmentierung älterer Menschen gerecht zu werden. Aufgrund der max. 90 min

Schlafdauer und individueller Schlafgewohnheiten waren in *Studie 2* stellenweise nur 3 (so-tDCS: N = 1; Sham N = 4) oder 4 Stimulationsblöcke (so-tDCS: N = 2; Sham: N = 1) möglich. In der Sham-Bedingung war die Anordnung der Elektroden dieselbe wie unter so-tDCS, der Stimulator blieb aber ausgeschaltet.

3.4 Schlaf-Daten

3.4.1 Aufzeichnung und Verarbeitung

Entsprechend dem internationalen 10-20-EEG-System wurden 26 Ag/AgCl-Elektroden (FP1, AFz, FP2, F7, Fz, F8, FC5, FC1, FC2, FC6, T7, C3, Cz, C4, T8, CP5, CP1, CP2, CP6, P7, P3, Pz, P4, P8, O1, O2) über eine fixierbare Elektrodenhaube am Kopf angebracht (Referenzelektrode: Nasenspitze; Erdungselektrode: FCz; Widerstand: < 5 k Ω ; Aufzeichnungsrate: 500 Hz; Bandpassfilter: 0,05-127 Hz). Die Gehirnströme wurden mittels BrainAmp Amplifier System abgeleitet und mit BrainVision Recorder aufgezeichnet (beide Produkte: Brain Products GmbH München, Deutschland). Zusätzlich wurde Muskelaktivität mittels EMG über 2 Kinnelektroden sowie die Augenbewegung über die Ableitung eines horizontalen und vertikalen EOG aufgezeichnet und die Aufnahmen für spätere Analysen gespeichert.

3.4.2 Schlafstadien-Bestimmung

Die EEG-Daten wurden mittels BrainVision Analyzer (Version 2.0, Brain Products GmbH München, Deutschland) auf 250 Hz herunter getaktet und durch halbautomatische bzw. visuelle Kontrolle von artefaktbelasteten Epochen bereinigt. Entsprechend den Kriterien von Rechtschaffen und Kales ([43]) wurden die Schlafstadien (SP1, SP2, SP3, SP4 und REM, Wachphasen, Bewegung) mittels des Programms SchlafAus (Steffen Gais, Lübeck, Deutschland) manuell bestimmt und die absolute/prozentual verbrachte Zeit in den einzelnen Schlafstadien berechnet, wobei artefaktbelastete Stimulationsblöcke aus der Schlafphasenbestimmung ausgeschlossen wurden. Um vergleichbare Werte in der Sham-Bedingung zu erhalten, wurden entsprechend markierte Sham-Stimulationsblöcke ebenfalls nicht bewertet. Zusätzlich wurden die Schlafphasen in den 1 min stimulations- und artefaktfreien Intervallen in 10 s Epochen entsprechend den obengenannten Kriterien gescort.

3.4.3 Spektral-Analyse

Für die bis zu 5 Interstimulus-Intervalle (bzw. ein zusätzliches 1 min Intervall vor dem ersten Stimulationsblock als Baseline) wurde der Effekt der so-tDCS auf die Power folgender

Frequenzbänder hin untersucht: langsame Oszillationen (SO: 0.5-1 Hz), langsame Spindeln (SlSp: 8-12 Hz) und schnelle Spindeln (FsSp: 12-15 Hz); für *Studie 2* wurde noch zusätzlich das Delta-Frequenzband (1-4 Hz) untersucht. Mittels einer Fast Fourier Transformation (Details siehe *Studie 1* und 2) wurde die Power in diesen Frequenzbändern für folgende Ableitpunkte bestimmt: *Studie 1* für SO und SlSp präfrontal (FP1, AFz, FP2) und frontal (FC1, Fz, FC2), für FsSp zentral (C3, Cz, C4) und zentro-parietal (CP1, Cz, CP2); *Studie 2* für SO, Delta, SlSp und FsSp frontal (FC1, Fz, FC2), für FsSp zentro-parietal (CP1, Cz, CP2).

3.4.4 Spindel-Analyse

Zusätzlich wurde in Studie 2 noch die Spindeldichte innerhalb der 1 min stimulations-freien Intervalle gemäß dem Protokoll früherer Studien [20,44] berechnet (langsame Spindeln an frontal, schnelle Spindeln an frontal und zentral-parietal). Nach der Filterung des EEG-Signals in entsprechende Frequenzen (8-12 Hz, 12-15 Hz) an den Ableitungen Fz, Cz und Pz wurde der Root Mean Square für jedes 100 ms Intervall errechnet. Jedes Überschreiten der Schwelle von 10 μ V innerhalb eines Zeitfensters (0,5 - 3 s) wurde als Event gezählt.

3.5 Gedächtnisaufgaben

3.5.1 Visuell-räumliche Aufgabe

Während der Lernrunde wurden 42 neutrale Bilder (Szenen, Objekte; [45,46]; in einem der 4 Bildschirmecken gezeigt (randomisierte Reihenfolge; je 2 s Anzeigedauer, 1 s Interstimulus-Intervall). Die Probanden sollten sich die Bilder und den Präsentationsort so gut wie möglich einprägen. Um *primacy-recency*-Effekte zu minimieren, wurden die ersten und letzten beiden Bilder jeder Liste (je eine für so-tDCS-/Sham-Bedingung) nicht ausgewertet (Puffer-Bilder). Während des nachfolgenden sofortigen Abrufs wurden die zuvor gezeigten Bilder (ALT), gemischt mit weiteren 38 neutralen Bildern (NEU). Es sollte per Tastendruck angegeben werden, ob man dieses Bild vorher schon sah oder nicht (ALT/NEU-Entscheidung). Bei einer ALT-Entscheidung (wenn korrekt: HIT) sollten die Probanden zusätzlich per Tastendruck angeben, wo dieses Bild zu sehen war (LOC). Nach dem Schlaf erfolgte ein verzögerter Abruf mit weiteren 38 neuen neutralen Bildern, wobei zu keinem Zeitpunkt während der Aufgabe ein Leistungs-Feedback gegeben wurde. Die aufgezeichneten Antworten (HIT, korrekte Zurückweisung bei richtig als NEU erkannte Bilder (CR), *False Alarms* bei irrtümlich als ALT erkannte NEU-Bildern (FA), MISS bei fehlender Erkennung der ALT-Bilder) wurden für die Analysen als Erkennungsleistung in einem Prozent korrekt Wert (Hits + CR) und als Maß für Antworttendenz: Hits + FA zusammengefasst, jeweils im Verhältnis zur Gesamtanzahl der

Bilder (in %). Die Leistung im Lokalisationsgedächtnis (Loc) wurde bestimmt als der Anteil der korrekt erinnerten Präsentationsorte im Verhältnis der gesamten als „ALT“ erinnerten Bilder (in %).

3.5.2 Wortpaar-Aufgabe

Aufbauend auf vorhergehenden Studien ([47,48]) wurden für die beiden Experimentalnächte zwei neue Parallelversionen von Wortlisten (so-tDCS-/Sham-Bedingung) mit 40 semantisch verknüpften, nicht-emotionalen, deutschen Substantiven erstellt und vorgetestet. Zur Minimierung von *primacy-recency* Effekten wurden auch hier zusätzlich 2 Puffer-Wörtern zu Beginn und Ende präsentiert. Die Listen folgten dabei dem Schema A-B/A-C, wobei ein Ober- (A) und ein Unter-Wort (B oder C) jeweils ein Wortpaar bildeten und in randomisierter Reihenfolge gelernt wurden. In einer vorläufigen Abrufunde wurde zunächst nur das Ober-Wort gezeigt, wobei die Probanden das – sofern möglich – dazugehörige Unter-Wort laut benennen sollen. Unabhängig von der Leistung wurde das vollständige Wortpaar anschließend noch einmal präsentiert (Feedback). In dem anschließenden sofortigen, als auch im verzögerten Abruf nach dem Schlaf, wurde nur das Ober-Wort gezeigt und die Probanden sollten wieder das dazugehörige Unter-Wort laut benennen (jeweils ohne Feedback). Die Leistung wurde mittels richtiger Wörter (Hits), fehlender Wörter (MISS), aber auch durch Intrusionen (neues B/C zu A) und Inferenzen (B aus vormals zu lernender Liste (inkl. der Testliste aus der Adaptationsnacht) genannt, obwohl C zu nennen war) ermittelt.

3.5.3 Prozedurale Aufgabe

In einer angepassten Version der Fingersequenz-Tapping-Aufgabe [49] sollten die Probanden eine vorgegebene Zahlensequenz (z.B. 4-2-3-1-4) mit der nicht-dominanten Hand auf einer Tastatur innerhalb von 30 s so oft, aber auch so korrekt wie möglich nachtippen. Zwischen den 4 Versuchsrunden (je 4 vor und nach dem Schlafen) lagen 30 s Pause. Für spätere Analysen wurde nur die Summe der korrekt getippten Sequenzen der letzten 3 Versuchsrunden gewertet.

3.6 TMS-PAS-Protokoll

Entsprechend des Protokolls von Classen et al. [24] wurden zur Ableitung der motorischen Reaktionen 2 Oberflächenelektroden an der Haut der dominanten Hand befestigt (Anode: Musculus abductor pollicis brevis; Kathode: Daumen). Mittels der TMS-Spule wurde am Handareal des motorischen Kortex auf der contra-lateralen Seite mittels magnetischer Pulse der optimale Punkt zur Auslösung eines motorisch evozierten Potentials (MEP) gesucht. Die im

PAS-Protokoll genutzte Reizintensität wurde festgelegt als diejenige, die zur Auslösung eines MEP mit einer mittlere Amplitude von 1 mV führt. Eine weitere bipolare Oberflächen-elektrode wurde am Handgelenk über den Nervus medianus am idealen Punkt zur Auslösung eines MEP im Daumen platziert (elektrischer Rechteckreiz; Dauer 200 μ s), wobei der 3-fache Wert der minimal wahrnehmbaren Reizintensität für das Protokoll genutzt wurde. Das Protokoll selbst beinhaltet (je nach Studie, siehe Studienmanuskript) 90, 132 oder 180 gepaarten Stimuli (magnet./elektr. > 25 ms Interstimulus-Intervall; 5 s oder 20 s Intervall; in *Studie 1* und 2: 132 Pulse). Vor (1x; Baseline-Messung) und nach der PAS-Intervention (3x Post-Messung: 0min, 15min, 30min; in die Auswertung floss nur Post 0 und 15 ein) werden 10 Pulse mittels TMS-Spule ausgelöst und für spätere Analysen aufgezeichnet.

3.7 Statistische Analyse

Für die Analyse der Frequenzdaten wurde ein gemischtes lineares Modell gerechnet [50], nachfolgend die Details für die *Studie 1* (Abweichungen im Modell für *Studie 2* kursiv in Klammern). Die EEG-Auswertungen basieren auf den 1 min stimulationsfreien Intervallen zwischen den Stimulationsblöcken, die als Faktor ZEIT in die Analysen eingehen (*zusätzlich quadrierte Intervalle zur Überprüfung eines kurvenförmigen Verlaufs; ZEIT²*). Des Weiteren wurde in das Modell die Abfolge der Stimulation als Faktor REIHENFOLGE (*nicht bei Studie 2*), die Stimulationsbedingung (so-tDCS vs. Sham) als Faktor STIM, die Interaktion ZEIT x STIM (*zusätzlich ZEIT² x STIM*) sowie das 1 min Intervall vor dem ersten Stimulationsblock als Faktor BASELINE mitaufgenommen. In *Studie 1* werden die Stimulationseffekte als modellbasierte Wahrscheinlichkeiten berichtet (mittlere Differenz (MD, so-tDCS minus Sham) \pm Standardfehler (SF)). Die post-hoc-Tests von *Studie 1* und 2 (ZEIT, ZEIT², ZEIT x STIM, ZEIT² x STIM, REIHENFOLGE, BASELINE) sowie die Stimulationseffekte der *Studie 2* werden als Regressions-Koeffizienten berichtet (nachfolgend β genannt \pm Standardfehler (SF)). Für die Spindelanalyse in *Studie 2* wurde ebenfalls dieses Modell genutzt.

Die Effekte auf die Gedächtnisleistung und auf offline erfasste Schlafphasen in den stimulationsfreien Intervallen wurden jeweils anhand von zweifaktoriellen Varianzanalysen(ANOVA) mit Messwiederholung ermittelt: mit den Faktoren ZEIT (Gedächtnis: vor/nach dem Schlaf; Schlafphasen: Interstimulus-Intervalle 1-5) und STIM (so-tDCS/Sham). Unterschiede in den Schlafphasen des gesamten Schlafes wurden entsprechend der Werte-Verteilung anhand von t-Tests für gepaarte Stichproben oder Wilcoxon-Rank-Tests geprüft.

In *Studie 3* wurde für die mittlere MEP-Größe eine ANOVA mit Messwiederholung gerechnet (Wiederholungs-Faktor ZEIT: Baseline, Post 0 und 15; Zwischensubjekt-Faktor STUDIE: Anzahl der Studien). Die Daten wurden noch zusätzlich dreimal transformiert: PAS_{diff} (Differenz Post zu Baseline), PAS_{quot} (Quotient Post/Baseline), $PAS_{logquot}$ (logarithmierter Quotient Post/Baseline) und mittels eines random-effects Regressionsmodells in der Software R ausgewertet. Als Index für die Heterogenität der Studien wurde Cochran's Q bestimmt. Die Berechnung der Ansprechrate auf das PAS-Protokoll erfolgte durch den Quotient „Mittelwert Post 0 und 15“/Baseline (Wert über 1 = positives Ansprechen). Rangbasierte Korrelationen (Spearman's Rho) wurden zwischen Alter, TMS-Intensität, elektrische Stimulationsintensität des peripheren Nervens, PAS_{quot} bzw. $PAS_{logquot}$ berechnet. Zusammenhänge zwischen absoluter PAS-induzierter Variabilität ($|PAS_{logquot}|$) und Alter wurden über Spearman's Rho, zwischen $PAS_{logquot}$ und Geschlecht bzw. Intervall (5 s oder 20 s) über punkt-biseriale Korrelation bestimmt. Werte werden – wenn nicht anders dargestellt - als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) berichtet.

Die statistische Auswertung erfolgte bei *Studie 1* und *3* mittels SPSS 22.0 (die random-effects Modelle per Software R), bei *Studie 2* mittels 19.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA). Das zweiseitige Signifikanzlevel wurde auf $\alpha = 0,05$ festgesetzt und wurde für die primären Parameter korrigiert für multiples Testen (nach Holm-Bonferroni in *Studie 1* – hier nachfolgend als p_c berichtet; Benjamin-Hochberg in *Studie 2*; Games-Howell für *Studie 3*).

4 Ergebnisse

Studie 1

Effekte auf Schlafphysiologie: Die Analyse der Frequenzbändern (Abb. 1) ergab einen positiven Einfluss der Stimulation auf die interessierenden Frequenzbänder mit Zunahme der Aktivität unter der so-tDCS-Bedingung im Vergleich zu Sham (Werte als MD (SF); SO präfrontal: 0,131 (0,039), $p = 0,001$, $p_c = 0,007$; SO frontal: 0,112 (0,045), $p = 0,013$, $p_c = 0,013$; SIsp präfrontal: 0,094 (0,029), $p = 0,001$, $p_c = 0,007$; SIsp frontal: 0,065 (0,029), $p = 0,002$, $p_c = 0,010$; FsSp zentral: 0,086 (0,028), $p = 0,003$, $p_c = 0,012$; FsSp zentro-parietal: 0,073 (0,030), $p = 0,018$, $p_c = 0,039$). In Bezug auf die übrigen Faktoren zeigte sich ein positiver ZEIT-Effekt nur bei SO-Power, die sich im Verlauf der 5 stimulations-freien Intervall erhöhte (präfrontal β (SF): 0,057 (0,019), $p = 0,004$; frontal β (SF): 0,067 (0,019), $p = 0,001$) und ein negativer ZEIT-Effekt bei FsSp (zentral β (SF): - 0,046 (0,013), $p < 0,001$; zentro-parietal β (SF): - 0,039 (0,014), $p = 0,006$) mit abnehmender Power über die 5 Intervalle hinweg. Alle weiteren Ko-

Faktoren waren nicht signifikant. In Bezug auf die Schlafphasen zeigte sich lediglich für die gesamte Nacht z in der Tiefschlafphase 4 ein signifikant negativer Einfluss der Stimulation ($z = -1,99$; $p = 0,046$). Bei Analyse des unmittelbaren Stimulationseffekt (stimulationsfreie Interstimulus-Intervalle) ergab sich ein Trend hin zu mehr Wachphasen unter so-tDCS ($z = -1,67$; $p = 0,096$) im Vergleich zu Sham.

Effekte auf die Gedächtnisleistung: Die signifikante Interaktion (ZEIT x STIM: $F_{(1,20)} = 5,08$, $p = 0,036$, $p_c = 0,039$) in der visuell-räumlichen Gedächtnisaufgabe deutet auf einen negativen Einfluss der Stimulation hin, die Probanden zeigten im Mittel nach der Stimulationsnacht eine Abnahme der Wiedererkennensleistung im Vergleich zur Sham-Bedingung. Weitere Stimulationseffekte waren statistisch nicht signifikant (Ortszuweisung, Wortpaar-Aufgabe, prozedurale Aufgabe). Lediglich ein ZEIT-Effekt in der prozeduralen Aufgabe konnte festgestellt werden, mit einem generellen Anstieg der korrekt getippten Sequenzen nach der Nacht (ZEIT: $F_{(1,20)} = 10,33$, $p = 0,004$).

Studie 2

Effekte auf Schlafphysiologie: Hinsichtlich der Frequenzbänder gab es einen positiven Einfluss der Stimulation auf SO (β (SF): $-0,18$ (0,008), $p = 0,029$) und auf die frontalen FsSp (β (SF): $-0,15$ (0,05), $p = 0,003$; erhöhte Power unter so-tDCS im Vergleich zu Sham) bzw. einen Trend bei FsSp an den zentro-parietalen Ableitungen (β (SF): $-0,09$ (0,05), $p = 0,054$; erhöhte Power unter so-tDCS im Vergleich zu Sham). Des Weiteren zeigte sich bei SO ein negativer ZEIT² - Effekt (β (SF): $-0,60$ (0,03), $p = 0,006$), der eine von der Stimulation unabhängige, invertierte, u-förmige Kurve über den Zeitverlauf ergab, sowie einen Trend in der Interaktion ZEIT² x STIM (β (SF): $-0,05$ (0,03), $p = 0,080$), was auf eine steilere Verlaufskurve unter Stimulation als auch unter Sham hindeutet. Für die S1Sp- und Delta-Aktivität konnte zusätzlich noch ein BASELINE-Effekt gezeigt werden (S1Sp β (SF): $0,57$ (0,10), $p < 0,001$; Delta β (SF): $0,54$ (0,16), $p = 0,002$), der einen Einfluss der prästimulus-Aktivität auf die Aktivität in den nachfolgenden Intervallen unabhängig von der Stimulation indiziert. Ähnlich der schnellen Spindelaktivität gab es lediglich einen positiven Stimulationseffekt bei der Dichte der schnellen Spindeln bei den schnellen Spindeln hinsichtlich einer höheren Spindelanzahl (Fz β (SF): $-0,99$ (0,46), $p = 0,033$; Pz β (SF): $-1,78$ (0,51), $p = 0,001$). Alle weiteren Faktoren (inkl. Schlafphasen: gesamter Schlaf, Intervalle) waren nicht signifikant.

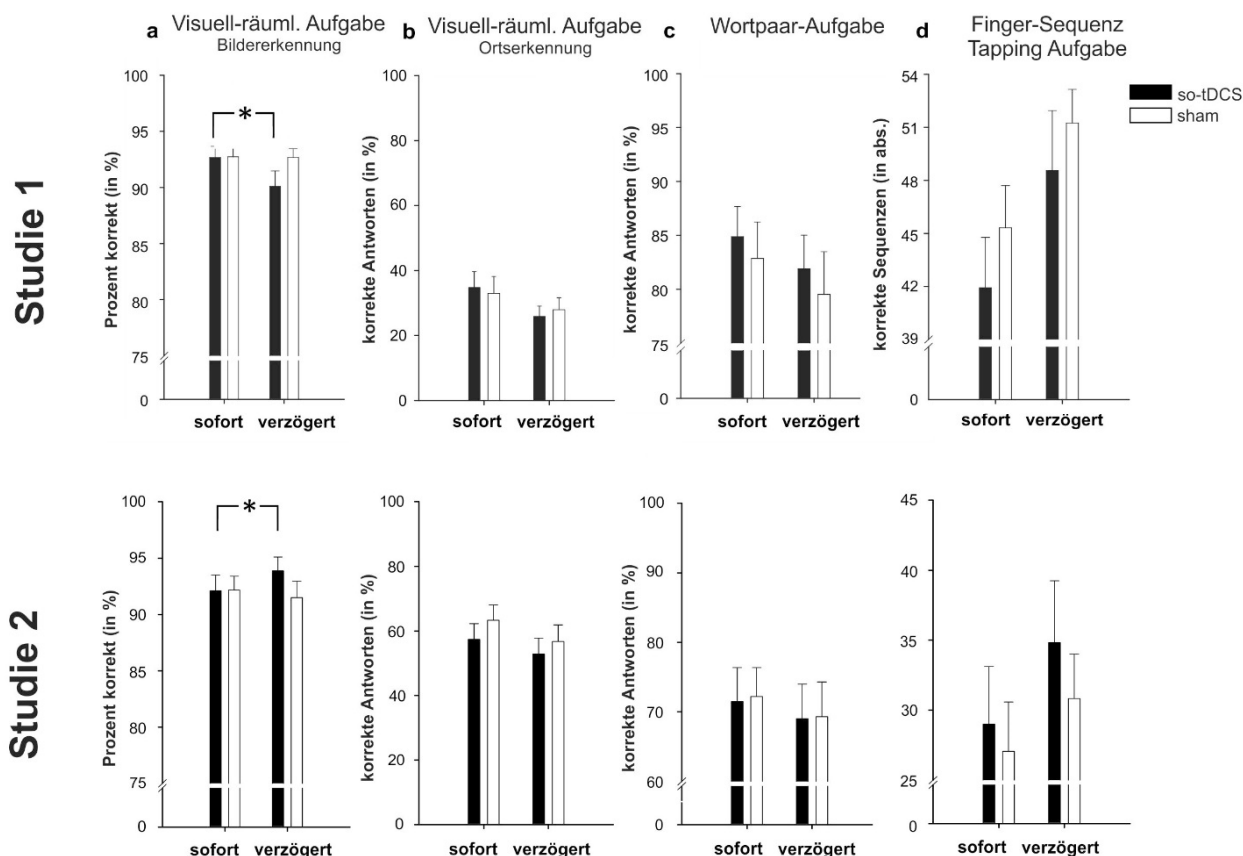


Abb. 1. Gedächtnisleistung in den deklarativen und prozeduralen Gedächtnisaufgaben von Studie 1 und 2 vor (sofort) und nach (verzögert) dem Schlaf in der so-tDCS (schwarze Balken) vs. Sham-Bedingung (weiße Balken). (a) Wiedererkennungsleistung (prozentualer Anteil der Summe aus HIT und korrekt zurückgewiesenen Bildern; in %) in der visuell-räumlichen Aufgabe. Studie 1: sign. Stimulationseffekt mit verringerter Bilderwiedererkennungsleistung nach so-tDCS im Vergleich zur Sham-Bedingung ($p = 0,036$). Studie 2: sign. Stimulationseffekt mit verbesserter Bilderwiedererkennungsleistung nach so-tDCS im Vergleich zur Sham-Bedingung ($p = 0,013$). (b) Die Behaltensleistung bezüglich des Ortes (Loc in %; korrekt angegebener Ort in Bezug auf korrekt erkannte Bilder) in der visuell-räumlichen Gedächtnisaufgabe zeigte kein Stimulationseffekt, weder in Studie 1 noch 2. (c) Abrufleistung (in %) in der verbalen Gedächtnisaufgabe. Kein Stimulationseffekt, weder in Studie 1 noch 2. (d) Korrekt getippte Zahlenreihen in der prozeduralen Aufgabe für so-tDCS und Sham-Bedingung. Kein Stimulationseffekt in der prozeduralen Aufgabe, weder in Studie 1 noch 2. Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler angezeigt. * $p < 0.05$. (Studie 1: $N = 21$; Studie 2: visuell-räumlich A. $N = 17$; Wortpaar-A. $N = 18$; prozedural A. $N = 17$).

Effekte auf die Gedächtnisleistung: Im Gegensatz zur Studie 1 zeigte sich bei der visuell-räumlichen Aufgabe ein signifikant positiver Effekt der Stimulation (ZEIT \times STIM: $F_{(1,16)} = 7,79$, $p = 0.013$), der auf eine verbesserte Abrufleistung nach der Stimulation im Vergleich zu Sham hindeutet. Weitere statistisch signifikante Stimulationseffekte ergaben sich nicht (Ortszuweisung, Wortpaaraufgabe, prozedurale Aufgabe). Lediglich ein positiver ZEIT-Effekt

war in der prozeduralen Aufgabe zu finden (ZEIT: $F_{(1,16)} = 5,80$, $p = 0,028$; genereller über Nacht Anstieg der korrekt getippten Zahlensequenzen).

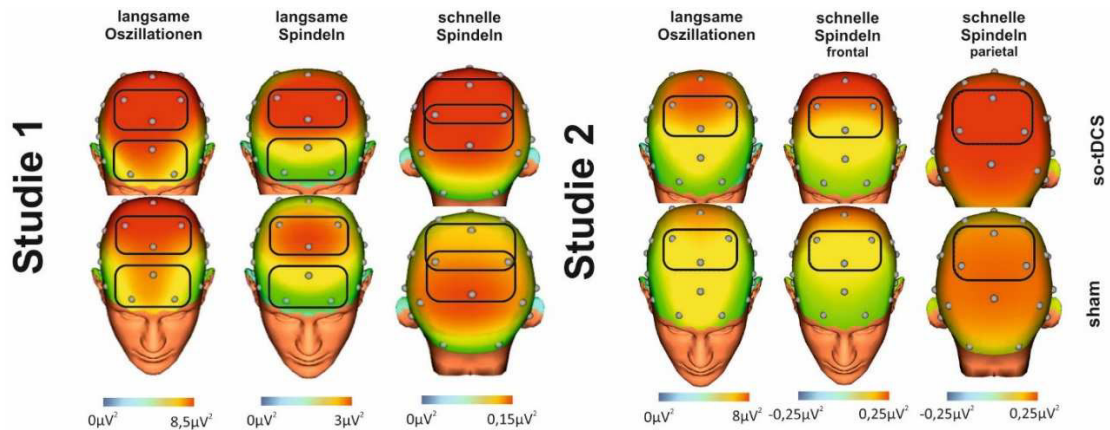


Abb. 2: EEG-Topographie der gemittelten Gehirnaktivität der stimulations-freien Intervalle 1 - max. 5, getrennt nach so-tDCS- und Sham-Bedingung. *Studie 1:* So-tDCS erhöht die EEG Aktivität innerhalb des SO- als auch des langsamen und schnellen Spindel-Frequenzbandes. *Studie 2:* Auch hier erhöht so-tDCS die EEG Aktivität innerhalb des SO- und des schnellen Spindel-Frequenzbandes. Die Abbildung zeigt die Topographie der Hirnaktivität an den präfrontalen/frontalen Ableitungen der SO- (0.5-1 Hz) und langsamen Spindel-Aktivität (8-12 Hz) sowie an den zentralen und zentro-parietalen Ableitungen der schnellen Spindel-Aktivität. Die Ableitungspunkte von Interesse wurden durch Linien gekennzeichnet (präfrontal: FP1, AFz, FP2; frontal: FC1, Fz, FC2; zentral: C3, Cz, C4; zentro-parietal: CP1, Cz, CP2). (*Studie 1:* N = 21; *Studie 2:* N = 18).

Studie 3

Die Analyse ergab einen allgemeinen Haupteffekt STUDIE ($F_{(8,181)} = 2,04$, $p = 0,044$), der Effekt ZEIT hingegen war nicht signifikant. Die signifikante Interaktion ZEIT x STUDIE ($F_{(16,362)} = 1,77$, $p = 0,034$) verschwand aber nach post-hoc Korrektur ($p_c = 0,256$). Die allgemeine Ansprechbarkeit auf das TMS-PAS-Protokoll betrug 53 % (101 von 190 Probanden), wobei die einzelnen Studien dahingehend sehr differierten (16,7 – 80 %). Keine der drei random-effects Modelle war statistisch signifikant. Nur das auf dem post/pre-Quotient beruhende Modell ergab einen Trend hinsichtlich eines höheren Effekts der Intervention ($PAS_{quot} (MW \pm SA)$): $1,11 \pm 0,08$). Die Heterogenität hingegen war hoch signifikant für alle 3 Modelle (Cochrane's Q: $p > 0,001$). Für die verbleibenden Parameter zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten rang-basierten Korrelationen, lediglich einen positiven Trend zwischen $|PAS_{logquot}|$ und Alter ($\rho = 0,13$, $p = 0,068$).

5 Diskussion

Studie 1

In dieser interventionellen Studie testeten wir den Einfluss eines exogen applizierten langsam oszillierenden Gleichstroms während des nächtlichen Tiefschlafs auf die Gedächtnisleistung in zwei deklarativen, Hippocampus-abhängigen Gedächtnissystemen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Stimulation unmittelbar positiv auf hirnpfysiologischer Ebene auf die kortikale SO Power und auch der Power in den Spindelbändern (SlSp, FsSp) auswirkte. Parallel dazu ließ sich aber keine signifikante Verbesserung in den deklarativen Gedächtnisaufgaben nachweisen - wie erwartet auch nicht in der prozeduralen Aufgabe. Es zeigte sich sogar ein negativer Einfluss der so-tDCS hinsichtlich der Verschlechterung im Wiedererkennen der Bilder nach dem Schlaf. Zudem führte die nächtliche Stimulation in der über die gesamte Nacht betrachteten Schlafarchitektur zur Reduktion der Tiefschlafphase 4. Aufgrund fehlender Studien zum visuell-räumlichen Gedächtnis ist eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse zu vorherigen Studien mit Stimulation schwierig. Es deutet aber, ähnlich wie in der Studie von Eggert und Kollegen [23], darauf hin, dass bei älteren Probanden durch nächtliche Stimulation des frühen Tiefschlafs die Gedächtnisleistung nicht verbessert werden kann. Zumindest nicht mit dem derzeit durchgeführten Stimulationsprotokoll.

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt in der Wortpaar-Aufgabe wäre die im Gegensatz zu bisherigen Listen [19,20,22,23,51] weitaus stärkere semantische Verknüpfung unserer Wortpaare. Vor allem schwache Assoziationen zwischen Items profitieren wesentlich mehr von nächtlicher Konsolidierung [52] als starke Assoziationen. Zum anderen könnte aber auch schon vorhandenes prä-semantisches Wissen einen möglichen Einfluss der Stimulation verdecken [53,54]. Des Weiteren bestanden unsere Listen aus nicht-emotionalen Substantivpaaren, wodurch unser Resultat auch die unterschiedlichen Mechanismen widerspiegeln könnte, die in der Enkodierung und schlafabhängigen Konsolidierung emotionaler und nicht-emotionaler Wörter involviert sind [55–57].

Die Tendenz zur Erhöhung der Wachphasen in den stimulus-freien Intervallen unter so-tDCS (konform mit Eggert et al. [23]) könnte eine direkte Reaktion auf die Stimulation sein, die damit einhergehende Fragmentierung des SWS somit zu der schlechteren Leistung in der visuell-räumlichen Aufgabe beigetragen haben. Ein - im Gegensatz zu jungen Menschen - späterer Beginn der Tiefschlafphasen bei älteren Menschen [58] und die Abhängigkeit des so-tDCS Effekts von der momentanen Hirnaktivität [59] lassen vermuten, dass das bisher verwendete

Protokoll für ältere Menschen weiter angepasst werden muss. Unterstützt wird diese Vermutung durch den signifikant reduzierten Anteil der Tiefschlafphase 4 bezogen auf die gesamte Nacht.

Studie 2

Wie in *Studie 1* konnten wir auch hier einen positiven Effekt auf die unmittelbaren relevanten hirnelektrophysiologischen Korrelate (Aktivität der langsamen Oszillationen und Spindelbänder) zeigen. Im Gegensatz zu Studie 1 gab es parallel dazu eine signifikante Verbesserung in der visuellen Wiedererkennung nach dem NAP mit Stim im Vergleich zur Sham-Bedingung. Bzgl. der Ortserkennung weisen die nur wenigen, gültigen Items auf hohe Schwierigkeiten hin, so dass zum einen die Aufgabe vielleicht nicht sensitiv genug ist, um Veränderungen abzubilden (Abfrage der Ortserkennung nur bei als ALT erkannten Items), zum anderen kann aber auch die relative Komplexität der visuell-räumlichen Aufgabe diskutiert werden. Befunde zeigen auf, dass positive so-tDCS Effekte primär bei der Konsolidierung relativ einfacher Aufgaben zu finden sind (siehe [60]). Bei den anderen Gedächtnisaufgaben (Wortpaar, prozedurales Gedächtnis) war kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationsbedingungen messbar. Dies kann - ähnlich wie für die Wörteraufgabe in Studie 1 argumentiert - mit spezifischen Merkmalen der verwendeten Aufgaben zusammenhängen. Bei der prozeduralen Aufgabe gab es, wie erwartet, keinen Effekt, welches sich mit bisherigen Befunden deckt [20,22,23,51].

Die auch hier gefundene gleichzeitige Erhöhung der SO und schnellen Spindel-Aktivität unter so-tDCS spricht für eine starke Kopplung der beiden [61–63] und somit für deren Relevanz in der Übertragung der Gedächtnisinhalte in den Neokortex [11]. Auch wenn bisher ein sehr unterschiedlicher Einfluss der so-tDCS auf die Spindelaktivität in verschiedenen Altersstufen beobachtet werden konnte [20,22,64], könnte dies ein Hinweis auf eine Interaktion von Alter und Stimulationszeitpunkt (Nacht vs. Nachmittag) sein, da die zwei Spindeltypen sich in der zirkadianen Regulation unterscheiden und auch unterschiedliche Sensitivität auf das Alter zeigen [65].

Studie 3

Ein kürzlich in einer Meta-Analyse gefundener TMS-PAS-Effekt [18] konnten wir hier nicht bestätigen. Die hohe Variabilität zwischen den 9 Studien hinsichtlich des Ansprechens auf die Intervention unterstreicht die auch in anderen Studien gezeigte hohe Variabilität [6,26]. Ebenso konform mit anderen Befunden [6,66] konnte hier ein Alters- und Geschlechtsunterschied festgestellt werden. Einschränkend ist festzuhalten, dass in Studie 3 nicht der gesamte

Altersbereich abgedeckt werden konnte (mittelalte, z.B. 30-50 Jahre sind unterrepräsentiert), wobei die Unterschiede zwischen den Studien diesen Alterseffekt mit beeinflusst haben könnten. Des Weiteren konnte der Einfluss einer niedrigeren elektrischen und magnetischen Stimulation auf einen höheren PAS-Effekt hier nicht repliziert werden [6], so wie wir auch keinen systematischen Einfluss unterschiedlicher Methoden zur Feststellung des idealen Punktes zur Auslösung des MEP per TMS-Spule feststellen konnten (Neuro-Navigation vs. freihändiges Suchen im motorischen Areal), wie es eine andere Studie nahelegte [67].

Allerdings zeigte sich, dass die Wahl der statistischen Analyse einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Ergebnis hat. Die Meta-Analyse von Wischnewski et al.[18] bezog sich ausschließlich auf bereits veröffentlichte Daten, deren gefundener PAS-Effekt auf einfache post/baseline Differenzen unter Verwendung einer ANOVA beruhte. Da MEPs nicht normal verteilt sind (in unserem Fall rechtsschief), können Ausreißer u.U. systematisch zu einer Überschätzung des Mittelwertes führen. Schon kleine Bewegungen oder Veränderungen in der Aufmerksamkeit nach Bestimmung der Stimulationsparameter können erhebliche Auswirkungen auf die Werte der Post-Messungen haben. Daher ist – auch wenn ein externer Gold-Standard zur Validierung statistischer Methoden fehlt – die Nutzung log-transformierter Daten bzw. absoluter MEP-Werte (Baseline- und Post-Messungen) indiziert. Ebenso könnte – ähnlich wie bei der tDCS – eine Stimulation in Abhängigkeit von der momentanen Aktivität des Gehirns (überprüfbar durch Echtzeit-EEG; [68,69]) die hohe Inter- und Intravariabilität verringern [70].

Fazit

Zusammenfassend zeigt sich auch in unseren Studien eine hohe Variabilität der transkraniellen Hirnstimulation bei älteren Menschen, wie dies auch schon Horvath und Carter und andere zeigen konnten ([5], Studien zu so-tDCS [19,22,23,42,51]; zu TMS: [6,26]). Des Weiteren konnten Scullin und Bliwise [71] aufzeigen, dass die Schlafparameter nicht in der Weise bei älteren Menschen mit der Konsolidierung Hippocampus-abhängiger Gedächtnisengramme im Nachtschlaf verknüpft zu sein scheinen, wie es bei jungen gesunden Probanden der Fall ist. Neue Methoden, wie zum Beispiel Analysen in Bezug auf Phasenamplituden und deren Kopplung über Frequenzen hinweg, könnten dabei sehr hilfreich sein, ein besseres Verständnis der funktionalen Zusammenhänge aufzuzeigen und auch in Bezug auf so-tDCS den Einfluss der Stimulation deutlicher zu machen [72]. Zusätzlich rücken spezifische Anpassungen des verwendeten Protokolls mehr und mehr in den Fokus, um u.a. den altersbedingten Veränderungen neuronaler Netzwerke wie auch neuroplastischer Prozesse

gerecht zu werden und damit Möglichkeiten zu erkunden, alters- wie auch pathologisch-bedingter kognitiver Einbußen entgegen zu wirken. Eine weitere Möglichkeit sind auch so genannte *closed-loop*-Systeme, welche eine zeitgenaue Kopplung der Stimulation an online detektierte SO ermöglichen, um so ganz spezifisch die Modulation gedächtnisrelevanter Hirnaktivität zu ermöglichen [73].

5 Literaturverzeichnis

- [1] Siebner H, Ziemann U. Das TMS-Buch - Handbuch der transkraniellen Magnetstimulation. 2007. doi:10.1007/978-3-540-71905-2_53.
- [2] Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP. Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 2000;290:533–6. doi:10.1126/science.290.5491.533.
- [3] Hornung OP, Danker-Hopfe H, Heuser I. Age-related changes in sleep and memory: commonalities and interrelationships. *Exp Gerontol* 2005;40:279–85. doi:10.1016/j.exger.2005.02.001.
- [4] Grady C. The cognitive neuroscience of ageing. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:491–505. doi:10.1038/nrn3256.
- [5] Horvath JC, Carter O, Forte JD. Transcranial direct current stimulation: five important issues we aren't discussing (but probably should be). *Front Syst Neurosci* 2014;8:2. doi:10.3389/fnsys.2014.00002.
- [6] Müller-Dahlhaus JFM, Orekhov Y, Liu Y, Ziemann U. Interindividual variability and age-dependency of motor cortical plasticity induced by paired associative stimulation. *Exp Brain Res* 2008;187:467–75. doi:10.1007/s00221-008-1319-7.
- [7] Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardised terminology, techniques, and scoring system for sleep stages of human subjects. Los Angeles UCLA Brain Inf Serv 1968.
- [8] Born J, Rasch B, Gais S. Sleep to Remember. *Neurosci* 2006;12:410–24. doi:10.1177/1073858406292647.
- [9] Tucker M a., Hirota Y, Wamsley EJ, Lau H, Chaklader A, Fishbein W. A daytime nap containing solely non-REM sleep enhances declarative but not procedural memory. *Neurobiol Learn Mem* 2006;86:241–7. doi:10.1016/j.nlm.2006.03.005.
- [10] van der Helm E, Gujar N, Nishida M, Walker MP. Sleep-Dependent Facilitation of Episodic Memory Details. *PLoS One* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0027421.
- [11] Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:114–26. doi:10.1038/nrn2762.
- [12] Rattenborg NC, Martinez-Gonzalez D, Roth TC, Pravosudov V V. Hippocampal memory consolidation during sleep: A comparison of mammals and birds. *Biol Rev* 2011. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00165.x.
- [13] Steriade M, McCormick D a, Sejnowski TJ. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* (80-) 1993;262:679–85.
- [14] Steriade M, Contreras D, Amzica F. Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments. *Trends Neurosci* 1994;17:199–208. doi:DOI: 10.1016/0166-2236(94)90105-8.
- [15] Rasch B, Born J. About Sleep's Role in Memory. *Physiol Rev* 2013;93:681–766. doi:10.1152/physrev.00032.2012.
- [16] Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, Benecke R, Classen J. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain* 2000;123:572–84.
- [17] Wolters A, Schmidt A, Schramm A, Zeller D, Naumann M, Kunesch E, et al. Timing-dependent plasticity in human primary somatosensory cortex. *J Physiol* 2005;565:1039–52. doi:jphysiol.2005.084954 [pii]r10.1113/jphysiol.2005.084954.
- [18] Wischniewski M, Schutter DJLG. Efficacy and time course of paired associative stimulation in cortical plasticity: Implications for neuropsychiatry. *Clin Neurophysiol* 2016;127:732–9. doi:10.1016/j.clinph.2015.04.072.
- [19] Marshall L, Mölle M, Hallschmid M, Born J. Transcranial direct current stimulation during sleep improves declarative memory. *J Neurosci* 2004;24:9985–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.2725-04.2004.
- [20] Marshall L, Helgadóttir H, Mölle M, Born J. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 2006;444:610–3. doi:10.1038/nature05278.
- [21] Marshall L, Molle M, Born J. Oscillating current stimulation – slow oscillation stimulation during sleep. *Nature* 2006:1–8. doi:10.1038/nprot.2006.299.
- [22] Westerberg CE, Florczak SM, Weintraub S, Mesulam M-M, Marshall L, Zee PC, et al. Memory improvement via slow-oscillatory stimulation during sleep in older adults. *Neurobiol Aging* 2015;36:2577–

86. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.014.
- [23] Eggert T, Dorn H, Sauter C, Nitsche MA, Bajbouj M, Danker-Hopfe H. No Effects of Slow Oscillatory Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) on Sleep-Dependent Memory Consolidation in Healthy Elderly Subjects. *Brain Stimul* 2013;6:938–45. doi:10.1016/j.brs.2013.05.006.
- [24] Nitsche MA, Paulus W. Transkranielle Gleichstrom stimulation. *2Das Tms-b.*, 2007, p. 533–42.
- [25] Stefan K, Kunesch E, Benecke R, Cohen LG, Classen J. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol* 2002;543:699–708. doi:10.1113/jphysiol.2002.023317.
- [26] López-Alonso V, Cheeran B, Río-Rodríguez D, Fernández-Del-Olmo M. Inter-individual variability in response to non-invasive brain stimulation paradigms. *Brain Stimul* 2014;7:372–80. doi:10.1016/j.brs.2014.02.004.
- [27] Sale M V., Ridding MC, Nordstrom MA. Cortisol Inhibits Neuroplasticity Induction in Human Motor Cortex. *J Neurosci* 2008;28:8285–93. doi:10.1523/JNEUROSCI.1963-08.2008.
- [28] Julkunen P, Säisänen L, Danner N, Niskanen E, Hukkanen T, Mervaala E, et al. Comparison of navigated and non-navigated transcranial magnetic stimulation for motor cortex mapping, motor threshold and motor evoked potentials. *Neuroimage* 2009;44:790–5. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.09.040.
- [29] Helmstaedter C, Lendt M, Lux S. VLMT: Verbal Learning and Memory Test. Beltz Test, Göttingen, Ger 1980.
- [30] Wechsler D. Wechsler adult intelligence scale - Fourth Edition (WAIS-IV). San Antonio, TX NCS Pearson 2008.
- [31] Van der Elst W, Van Boxtel MPJ, Van Breukelen GJP, Jolles J. The Stroop color-word test: influence of age, sex, and education; and normative data for a large sample across the adult age range. *Assessment* 2006;13:62–79. doi:10.1177/1073191105283427.
- [32] Tombaugh TN. Trail Making Test A and B: Normative data stratified by age and education. *Arch Clin Neuropsychol* 2004;19:203–14. doi:10.1016/S0887-6177(03)00039-8.
- [33] Gatterer G. Der Alters-Konzentrations-Test (A-K-T) und Zusatz (A-K-T) und Zusammenhang, Merkfähigkeit, Orientierung und Fremdbeurteilung bei geriatrischen Patienten zwischen 60 und 85 Jahren in einem Pflegeheim. *Z Gerontol* 1988;21:32–7.
- [34] Watson D, Clark LA, Tellegen A. Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *J Pers Soc Psychol* 1988;54:1063–70. doi:10.1037/0022-3514.54.6.1063.
- [35] Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 1989;28:193–213. doi:10.1016/0165-1781(89)90047-4.
- [36] Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14:540–5. doi:10.1016/j.sleep.2007.08.004.
- [37] Griefahn B, Künemund C, Bröde P, Mehnert P. Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg. *Somnologie* 2001;5:71–80. doi:10.1046/j.1439-054X.2001.01149.x.
- [38] Frohnhofen H, Bibl M, Nickel B, Popp R. Der Essener Fragebogen Alter und Schläfrigkeit (EFAS) - ein neues Assessmentinstrument zur Messung von Tagesschläfrigkeit bei alten Menschen. *Eur J Ger* 2010;12:84–9.
- [39] Zimmermann P, Fimm B. Test for attentional performance (TAP). *PsyTest*, Herzogenrath 1995:76–7.
- [40] Luria RE. The validity and reliability of the Visual Analogue Mood scale. *J Psychiatr Res* 1975;12:51–7. doi:10.1016/0022-3956(75)90020-5.
- [41] Bes F, Wilde-Frenz J, Schulz H. Application of the Tiredness Symptoms Scale during sleep deprivation. *Sleep-Wake Res Netherlands* 1992;3:19–20.
- [42] Marshall L, Helgadóttir H, Mölle M, Born J. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 2006;444:610–3. doi:10.1038/nature05278.
- [43] Materialien. Schlafstadienbestimmung nach RECHTSCHAFFEN und KALES. System 1968:5–10.
- [44] Gais S, Mölle M, Helms K, Born J. Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J Neurosci* 2002;22:6830–4. doi:20026697.
- [45] Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN. International affective picture system (IAPS): Affective ratings of pictures and instruction manual. Tech Rep A-8 2008.
- [46] Schneider TR, Engel AK, Debener S. Multisensory identification of natural objects in a two-way crossmodal priming paradigm. *Exp Psychol* 2008;55:121–32. doi:10.1027/1618-3169.55.2.121.
- [47] Binder S, Berg K, Gasca F, Lafon B, Parra LC, Born J, et al. Transcranial slow oscillation stimulation during sleep enhances memory consolidation in rats. *Brain Stimul* 2014;7:508–15. doi:10.1016/j.brs.2014.03.001.
- [48] Plihal W, Born J. Effects of Early and Late Nocturnal Sleep on Declarative and Procedural Memory. *J Cogn Neurosci* 1997;9:534–47. doi:10.1162/jocn.1997.9.4.534.

- [49] Walker MP, Brakefield T, Morgan A, Hobson JA, Stickgold R. Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning. *Neuron* 2002;35:205–11. doi:10.1016/S0896-6273(02)00746-8.
- [50] Verbeke G, Molenberghs G. Linear mixed models for longitudinal data. 2000.
- [51] Sahlem GL, Badran BW, Halford JJ, Williams NR, Korte JE, Leslie K, et al. Oscillating square wave Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) delivered during slow wave sleep does not improve declarative memory more than sham: A randomized sham controlled crossover study. *Brain Stimul* 2015;06. doi:10.1016/j.brs.2015.01.414.
- [52] Drosopoulos S, Schulze C, Fischer S, Born J. Sleep's Function in the Spontaneous Recovery and Consolidation of Memories 1967. doi:10.1037/0096-3445.136.2.169.
- [53] Arbuckle TY, Cooney R, Milne J, Melchior A. Memory for spatial layouts in relation to age and schema typicality. *Psychol Aging* 1994;9:467. doi:10.1037/0882-7974.9.3.467.
- [54] Castel AD. Memory for grocery prices in younger and older adults: the role of schematic support. *Psychol Aging* 2005;20:718–21. doi:10.1037/0882-7974.20.4.718.
- [55] Kensinger E a, Corkin S. Memory enhancement for emotional words: are emotional words more vividly remembered than neutral words? *Mem Cognit* 2003;31:1169–80. doi:10.3758/BF03195800.
- [56] Wagner U, Degirmenci M, Drosopoulos S, Perras B, Born J. Effects of cortisol suppression on sleep-associated consolidation of neutral and emotional memory. *Biol Psychiatry* 2005. doi:10.1016/j.biopsych.2005.05.008.
- [57] Wagner U, Born J. Memory consolidation during sleep: interactive effects of sleep stages and HPA regulation. *Stress* 2008;11:28–41. doi:10.1080/10253890701408822.
- [58] Gigli GL, Placidi F, Diomedi M, Maschio M, Silvestri G, Scalise a, et al. Sleep in healthy elderly subjects: a 24-hour ambulatory polysomnographic study. *Int J Neurosci* 1996;85:263–71. doi:10.3109/00207459608986687.
- [59] Kirov R, Weiss C, Siebner HR, Born J, Marshall L. Slow oscillation electrical brain stimulation during waking promotes EEG theta activity. *PNAS* 2009;106:15460–5. doi:10.1073/pnas.0904438106.
- [60] Barham MP, Enticott PG, Conduit R, Lum JAG. Transcranial electrical stimulation during sleep enhances declarative (but not procedural) memory consolidation: Evidence from a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 2016. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.01.009.
- [61] Mölle M, Marshall L, Gais S, Born J. Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 2002;22:10941–7. doi:22/24/10941 [pii].
- [62] Mölle M, Bergmann TO, Marshall L, Born J. Fast and Slow Spindles during the Sleep Slow Oscillation : Disparate Coalescence and Engagement in Memory Processing. *Sleep* 2011;34:11. doi:10.5665/sleep.1290.
- [63] Steriade M, Timofeev I, Neurophysiologie L De. Neuronal Plasticity in Thalamocortical Review Networks during Sleep and Waking Oscillations. *Neuron* 2003;37:563–76.
- [64] Antonenko D, Diekelmann S, Olsen C, Born J, Mölle M. Napping to renew learning capacity: enhanced encoding after stimulation of sleep slow oscillations. *Eur J Neurosci* 2013;37:1142–51. doi:10.1111/ejn.12118.
- [65] Gennaro L De, Ferrara M. Sleep spindles : an overview 2003;7. doi:10.1016/S1087-0792(02)00116-8.
- [66] Strube W, Bunse T, Malchow B, Hasan A. Efficacy and interindividual variability in motor-cortex plasticity following anodal tDCS and paired-associative stimulation. *Neural Plast* 2015;2015. doi:10.1155/2015/530423.
- [67] Nieminen JO, Koponen LM, Ilmoniemi RJ. Experimental characterization of the electric field distribution induced by TMS devices. *Brain Stimul* 2015;8:582–9. doi:10.1016/j.brs.2015.01.004.
- [68] Gharabaghi A, Kraus D, Leão MT, Spüler M, Walter A, Bogdan M, et al. Coupling brain-machine interfaces with cortical stimulation for brain-state dependent stimulation: enhancing motor cortex excitability for neurorehabilitation. *Front Hum Neurosci* 2014;8:122. doi:10.3389/fnhum.2014.00122.
- [69] Sergeeva EG, Henrich-Noack P, Bola M, Sabel BA. Transcranial direct current stimulation - Update 2011. *Front Neurosci* 2014;8:1–2. doi:10.3233/RNN-2011-0618.
- [70] Fratello F, Veniero D, Curcio G, Ferrara M, Marzano C, Moroni F, et al. Modulation of corticospinal excitability by paired associative stimulation: reproducibility of effects and intraindividual reliability. *Clin Neurophysiol* 2006;117:2667–74. doi:10.1016/j.clinph.2006.07.315.
- [71] Scullin MK, Bliwise DL. Sleep, Cognition, and Normal Aging: Integrating a Half Century of Multidisciplinary Research. *Perspect Psychol Sci* 2015;10:97–137. doi:10.1177/1745691614556680.
- [72] Niknazar M, Krishnan GP, Bazhenov M, Mednick SC. Coupling of thalamocortical sleep oscillations are important for memory consolidation in humans. *PLoS One* 2015;10:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0144720.
- [73] Ngo H-VV, Martinetz T, Born J, Mölle M. Auditory Closed-Loop Stimulation of the Sleep Slow Oscillation Enhances Memory. *Neuron* 2013;78:545–53. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.006.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sven Paßmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss transkranieller Hirnstimulation auf die kognitive und motorische Leistung gesunder, älterer Probanden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

30.08.2016

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Sven Paßmann hatte folgenden Anteil an den nachkommenden Publikationen:

Publikation 1: Sven Paßmann, Nadine Külzow, Julia Ladenbauer, Daria Antonenko, Ulrike Grittner, Sascha Tamm, Agnes Flöel. Boosting slow oscillatory activity using tDCS during early nocturnal slow wave sleep does not improve consolidation in healthy older adults. *Brain Stimulation*, 2016.

Beitrag im Einzelnen: 80%; Studienkoordination, Patientenrekrutierung, Erhebung Verwaltung und Analyse der Daten, Verfassung und Revision des Manuskripts.

Publikation 2: Julia Ladenbauer, Nadine Külzow, **Sven Paßmann**, Daria Antonenko, Ulrike Grittner, Sascha Tamm, Agnes Flöel. Brain Stimulation during an afternoon nap boosts slow oscillatory activity and memory consolidation in older adults. *Neuroimage*, 2016.

Beitrag im Einzelnen: 20%; Studienkoordination, Beteiligung an Datenaufbereitung, Datenanalyse, Mitarbeit bei Manuskriptverfassung und Revision.

Publikation 3: Jacob Lahr*, **Sven Paßmann***, Jonathan List, Werner Vach, Agnes Flöel, Stefan Klöppel. Effects of different analysis strategies on paired associative stimulation. A pooled data analysis from three research labs. *PLoS ONE*, 2016.

Beitrag im Einzelnen: 50%; Studienkoordination, Patientenrekrutierung, Erhebung und Verwaltung der Daten, Beteiligung an Datenaufbereitung und Datenanalyse, Mitarbeit bei Manuskriptverfassung und Revision.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Ausgewählte Publikationen

Publikation 1:

Paßmann S, Külzow N, Ladenbauer J, Antonenko D, Grittner U, Tamm S, Flöel A. Boosting slow oscillatory activity using tDCS during early nocturnal slow wave sleep does not improve consolidation in healthy older adults. *Brain Stimulation*, 2016.

Impact Factor: 4.399

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2016.04.016>

Publikation 2:

Ladenbauer J, Külzow N, **Paßmann S**, Antonenko D, Grittner U, Tamm S, Flöel A. Brain Stimulation during an afternoon nap boosts slow oscillatory activity and memory consolidation in older adults. *NeuroImage*, 2016

Impact Factor: 4.399

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.06.057>

Publikation 3:

Lahr J*, **Paßmann S***, List J, Vach W, Flöel A, Klöppel S. Effects of different analysis strategies on paired associative stimulation. A pooled data analysis from three research labs. *PLOS ONE*, 2016.

Impact Factor: 3.234

RESEARCH ARTICLE

Effects of Different Analysis Strategies on Paired Associative Stimulation. A Pooled Data Analysis from Three Research Labs

Jacob Lahr^{1,2,3☉*}, Sven Paßmann^{4☉}, Jonathan List⁴, Werner Vach⁵, Agnes Flöel^{4,6,7‡}, Stefan Klöppel^{1,2,3,8‡}

1 Freiburg Brain Imaging, University Medical Center, Freiburg, Germany, **2** Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center, Freiburg, Germany, **3** Department of Neurology, University Medical Center, Freiburg, Germany, **4** Department of Neurology, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany, **5** Center for Medical Biometry and Medical Informatics, University of Freiburg, Freiburg, Germany, **6** Center for Stroke Research Berlin, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany, **7** Cluster of Excellence NeuroCure, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany, **8** Center of Geriatrics and Gerontology Freiburg, University Medical Center, Freiburg, Germany

☉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* jacob.lahr@uniklinik-freiburg.de



OPEN ACCESS

Citation: Lahr J, Paßmann S, List J, Vach W, Flöel A, Klöppel S (2016) Effects of Different Analysis Strategies on Paired Associative Stimulation. A Pooled Data Analysis from Three Research Labs. *PLoS ONE* 11(5): e0154880. doi:10.1371/journal.pone.0154880

Editor: Robert Chen, University of Toronto, CANADA

Received: January 14, 2016

Accepted: April 20, 2016

Published: May 4, 2016

Copyright: © 2016 Lahr et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: This is a pooled analysis across nine studies (see [Table 1](#)). Data may be accessed by contacting the corresponding author, as data upload to a public repository is not covered by the individual participant consent.

Funding: The article processing charge was funded by the German Research Foundation (DFG) and the Albert Ludwigs University Freiburg in the funding programme Open Access Publishing.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Paired associative stimulation (PAS) is a widely used transcranial magnetic stimulation (TMS) paradigm to non-invasively induce synaptic plasticity in the human brain in vivo. Altered PAS-induced plasticity has been demonstrated for several diseases. However, researchers are faced with a high inter- and intra-subject variability of the PAS response. Here, we pooled original data from nine PAS studies from three centers and analyzed the combined dataset of 190 healthy subjects with regard to age dependency, the role of stimulation parameters and the effect of different statistical methods. We observed no main effect of the PAS intervention over all studies ($F(2;362) = 0.44$; $p = 0.644$). The rate of subjects showing the expected increase of motor evoked potential (MEP) amplitudes was 53%. The PAS effect differed significantly between studies as shown by a significant interaction effect ($F(16;362) = 1.77$; $p = 0.034$) but post-hoc testing did not reveal significant effects after correction for multiple tests. There was a trend toward increased variability of the PAS effect in older subjects. Acquisition parameters differed across studies but without systematically influencing changes in MEP-size. The use of post/baseline quotients systematically indicated stronger PAS effects than post/baseline difference or the logarithm of the post/baseline quotient. The non-significant PAS effects across studies and a wide range of responder rates between studies indicate a high variability of this method. We were thus not able to replicate findings from a previous meta-analysis showing robust effects of PAS. No pattern emerged regarding acquisition parameters that at this point could guide future studies to reduce variability and help increase response rate. For future studies, we propose to report the responder rate and recommend the use of the logarithmized post/baseline quotient for further analyses to better address the possibility that results are driven by few extreme cases.

Introduction

Neuronal plasticity is the basis of learning and memory and leads to changes on a molecular, cellular and systemic level. On the synaptic level, long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) are omnipresent mechanisms of neuronal plasticity. This bidirectional synaptic plasticity can be induced by tetanic stimulation at high (LTP) or low (LTD) frequencies or by associative pre- and postsynaptic stimulation and characteristically depends on the activity of postsynaptic NMDA receptors [1]. LTP/LTD have been studied extensively in animal tissue slices [2], and also in surgically removed human hippocampus specimens [3]. However, it cannot be assessed in the human brain *in vivo*.

Paired-associative stimulation (PAS) is one of the most frequently used transcranial magnetic stimulation (TMS) protocols to non-invasively induce neural plasticity in the intact human brain [4–6]. For PAS, electrical stimulation of a peripheral nerve (e.g. median nerve) and TMS of the contralateral primary motor cortex (M1) are repetitively coupled. Depending on the exact timing of the stimuli, this leads to an increase or decrease of motor evoked potentials (MEP). At an interstimulus-interval of 25 ms, MEP amplitudes are increased, and at an interstimulus interval of 10 ms, the amplitudes are decreased [5]. MEP amplitude changes have been shown to begin directly after PAS intervention and to last for a duration of at least one hour [4,6].

Experimental paradigms that induce neural plasticity in the intact human brain are often referred to as „LTP-like“ as they share some but not all characteristics with LTP and as the underlying mechanisms are not completely understood. For PAS, three requirements for an LTP-like mechanism, namely stimulus-timing dependence [5], NMDA-receptor dependence [7] and associativity [4] have been demonstrated.

A large scale quantitative review provided strong indication for a robust PAS effect which was strongest for an inter-trial interval of 5 or 20 s [6]. On the other hand, a high inter-individual variability and a response to PAS in the expected direction in only 60% and even 39% of participants found in two well powered studies challenge such conclusions [8,9]. Small effect sizes and a high variability have recently been reported not only for PAS but also for other methods of non-invasive brain stimulation and are intensively debated [10,11]. Despite that, systematic alterations of PAS have been demonstrated in a variety of neuropsychiatric disorders, including Alzheimer’s disease [12,13], depression [14], schizophrenia [15] or writer’s cramp [16].

Previous studies identified several factors such as age [8], time of day [17], attention [18] or cortical anatomy [19] to account for some of its variability, but these were not necessarily replicated and even small changes in the parameter sets may impact the results substantially. There is not yet a consensus if optical navigation for TMS coil placement has a positive effect on the variability of MEPs [20–22]. Other factors include the strength of the peripheral electrical stimulation which affects the number of stimulated afferent fibers as well as the strength of the cortical stimulation as this will influence the number of I-waves [23]. One study [8] found that a lower stimulator output necessary to induce a 1mV MEP correlated with a stronger PAS effect.

Finally, the choice of data analysis methods and statistical analyses also influences the results. This concerns the averaging across the individual trials of a participant at a given time point (e.g. at baseline or at various intervals after the PAS-intervention) and the averaging across individuals for each time point but also the transformations (post/baseline differences, quotients, or logarithmized quotients). The majority of studies relies on post/baseline differences for analysis of the main PAS effect by using ANOVA, and on quotients for further analyses such as e.g. correlations.

Our own experience [24–30] and that of others [8,9] with PAS but also relatively well powered studies using other means for non-invasive brain stimulation [19,31] led us to perform a meta-analysis on original data for comparison to the recent review by Wischniewski and colleagues [6]. These authors reported that the PAS protocol remained robust even after removing studies with potential overestimation of effect size. On the other hand, their analysis had to be based on published data while ample evidence indicate that studies with a null effect tend to remain unpublished [32].

We therefore performed a meta-analysis based on our original published and unpublished data from nine studies performed by two TMS research groups at three different laboratories. We aimed at evaluating the robustness of the PAS effect. In addition, we sought to quantify the influence of stimulation parameters, age, gender and statistical methods in the analysis of PAS. We additionally tested for associations between the extend of the PAS effect and age as well as magnetic stimulation strength as both has been indicated in a previous study [8]. Finally, we also examined correlations between PAS and the peripheral electrical stimulation strength.

Methods

Subjects

Healthy control subjects from nine studies conducted at three German centers (Charité Universitätsmedizin Berlin, University Medical Center Münster, University Medical Center Freiburg) were included in this study (Table 1). The studies were approved by the respective local ethics commissions (Ethik-Kommission der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg for studies A & B, Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster for studies C & D, Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin for Studies E–I) and all participants gave their written informed consent.

PAS acquisition protocols

The differences of the experimental procedures of the included studies are outlined in Table 2.

Data Processing and Statistical Analysis

The mean MEP size was calculated for each time-point (baseline and post-measurements) and for each subject. Testing MEPs for normality using Shapiro-Wilks test indicated no normal distribution. A repeated measures analysis of variance (rmANOVA) was calculated using SPSS software (Version 22.0) with the factor TIME (three levels: before PAS (pre), directly after PAS

Table 1. Summary of subjects and studies.

study	center	age (years)	gender (f/m)	N	Responder rate	initially published in
A	Freiburg	69.6 ± 5.7	19/9	28	53.6% (15)	Lahr et al. [30]
B	Freiburg	24.0 ± 2.0	14/18	32	62.5% (20)	Klöppel et al. [29]
C	Münster	49.9 ± 8.3	8/4	12	16.7% (2)	List et al. [24]
D	Münster	70.5 ± 3.6	10/10	20	80% (16)	List et al. [26]
E	Berlin	63.6 ± 12.8	4/6	10	60% (6)	List et al. [28]
F	Berlin	65.3 ± 5.2	12/8	20	35% (7)	Unpublished
G	Berlin	63.9 ± 6.2	16/14	30	60% (18)	List et al. [27]
H	Berlin	25.8 ± 5.9	2/21	23	52.2% (12)	Unpublished
I	Berlin	64.3 ± 6.1	7/8	15	33.3% (5)	Unpublished
Σ			92/98	190		

doi:10.1371/journal.pone.0154880.t001

Table 2. Methodological differences in the PAS paradigm between the studies.

Study	A & B	C & D	E	F	G	H	I
PAS	180 paired stimuli, interval of 5 s, interstimulus interval of 25 ms between electrical and magnetic stimulus	90 paired stimuli, interval of 20 s, ISI 25 ms between electrical and magnetic stimulus	132 paired stimuli, interval of 5 s, ISI 25 ms between electrical and magnetic stimulus	132 paired stimuli, interval of 5 s, ISI 25 ms between electrical and magnetic stimulus	132 paired stimuli, interval of 5 s, ISI 25 ms between electrical and magnetic stimulus	132 paired stimuli, interval of 5 s, ISI 25 ms between electrical and magnetic stimulus	132 paired stimuli, interval of 5 s, ISI 25 ms between electrical and magnetic stimulus
TMS	TMS adjusted to 1 mV unconditioned MEP amplitude. 20 MEPs per condition. Post measurements at 0, 8 and 15 minutes post intervention.	TMS 0.5–1.0 mV interval 10 s, 20 MEPs per condition. Post measurements at 0, 15, 30 (60 min for study C) post intervention.	TMS 0.5–1.0 mV; 10 MEPs per condition; post measurements at 0, 15, 30 post intervention.	TMS 0.5–1.0 mV; 10 MEPs per condition; post measurements at 0, 15, 30 post intervention.	TMS 0.5–1.0 mV; 10 MEPs per condition; post measurements at 0, 15, 30 post intervention.	TMS 0.5–1.0 mV; 10 MEPs per condition; post measurements at 0, 15, 30 post intervention.	TMS 0.5–1.0 mV; 10 MEPs per condition; post measurements at 0, 15, 30 post intervention.
E-Stim	300% of perception threshold at median nerve	300% perception threshold at ulnar nerve	300% of perception threshold at median nerve	300% perception threshold at median nerve (some participants did not tolerate stimulation at 300% perception threshold, there the stimulation intensity was adjusted individually (mean 273%), a visible twitch of the thumb was required)	300% of perception threshold at median nerve	300% of perception threshold at median nerve	300% perception threshold at median nerve (some participants did not tolerate stimulation at 300% perception threshold, there the stimulation intensity was adjusted individually (mean 277%), a visible twitch of the thumb was required)
Muscle	APB (right Hand, only right handed subjects)	ADM (dominant hand)	APB (right Hand, only right handed subjects)	APB (right Hand, only right handed subjects)	APB (right Hand, only right handed subjects)	APB (right Hand, only right handed subjects)	APB (right Hand, only right handed subjects)
Other	Neuronavigation, Attention monitored by counting visual stimuli Experiment conducted in the afternoon.	Experiment conducted between 10 AM and 3 PM Attention monitored by counting number of ulnar nerve stimulations		Experiment conducted between 9 AM and 6 PM Attention monitored by counting number of ulnar nerve stimulations		Experiment conducted between 9 AM and 6 PM Attention monitored by counting number of median nerve stimulations	Experiment conducted between 9 AM and 5 PM Attention monitored by counting number of ulnar nerve stimulations

doi:10.1371/journal.pone.0154880.t002

(post0) and 15 min after PAS (post15) as these measurements were available in all studies) as repeated measures factor and STUDY (nine levels) as between subjects factor. In case of a significant interaction, Games-Howell correction was applied to post-hoc testing. Degrees of freedom were adjusted by the Huynh-Feldt method, when the assumption of sphericity was violated.

Three different data transformations of the baseline and averaged post MEP measurements were compared: the difference between post and baseline (PAS_{diff}), the post/baseline quotient (PAS_{quot}), and the logarithm of the quotient ($PAS_{logquot}$).

A random-effects regression model was fitted to each of the transformed data sets using the metafor library in R [33] and heterogeneity between studies was assessed with Cochran's Q-test. Results are displayed using a Forest plot.

For calculation of the responder-rate, the quotient of the averaged post measurements and the baseline measurement effect was calculated [8]. Subjects attaining values above one were thus considered as PAS-responders. Rank based correlation (Spearman’s rho) between age, TMS intensity (in percent of maximal stimulator output: %MSO), electrical peripheral nerve stimulation intensity (mA), $PAS_{logquot}$ and $|PAS_{logquot}|$ was calculated. Following the approach by Müller Dahlhaus et al. (2008) association between age and the absolute variability (i.e. MEP increases or decreases) induced by PAS was assessed by correlating $|PAS_{logquot}|$ with age using Spearman’s rho. Association between gender and $PAS_{logquot}$ and between inter-trial interval (5 s or 20 s) and $PAS_{logquot}$ were assessed using point-biserial correlation which is equivalent to a t-test but directly provides a measure of effect size.

To assess the influence of different data transformations, we visualized MEPs relative to baseline from all participants displaying the mean from all participants of a given timepoint and study. This visualization was contrasted with a visualization where the mean and the standard error were calculated on the logarithmized data. To further underline the influence of different averaging methods, we also visualized the mean, the median, and the mean of the log-transformed data that was back transformed to linear space using the following formula:

$$log\ transformed\ data = 10^{mean(log_{10}(data))}$$

Results

Data from PAS experiments of nine different studies were analyzed using an rmANOVA on the baseline, post0, and post15 measurements (Tables 1 and 2). There was no main effect of TIME over all studies ($F(2;362) = 0.44; p = 0.644$; Table 3) while the main effect of STUDY was significant ($F(8;181) = 2.04; p = 0.044$; Table 3). The overall responder rate was 53.2% (101 out of 190 subjects). The interaction TIME x STUDY was significant ($F(16;362) = 1.77; p = 0.034$; Table 3) but post-hoc testing did not reveal significant effects after correction for multiple testing (Games-Howell procedure; minimal p-value = 0.256). Responder rates for the individual studies were between 16.7–80% (Table 1).

None of the three random-effects meta-analyses indicated an overall effect of PAS. The model based on the post/pre quotients indicated a (not significantly) higher effect of PAS ($PAS_{quot}: 1.11 \pm 0.08$; S1 Fig), while the models based on the differences ($PAS_{diff}: 0.02 \pm 0.06$ mv; S2 Fig) and logarithmized quotients ($PAS_{logquot}: 0.01 \pm 0.03$; Fig 1) indicated comparable results. Heterogeneity as assessed by Cochran’s Q was significant at a level $p < 0.001$ for all three models.

There was a trend towards a positive association between variability of $PAS_{logquot}$ and age ($\rho = 0.13; p = 0.068$; Fig 2), and no significant correlation between $PAS_{logquot}$ and age ($\rho = 0.07; p = 0.308$; Fig 2), electrical peripheral nerve stimulation intensity ($\rho = -0.15; p = 0.091$, Fig 3, left panel) and TMS intensity ($\rho = -0.01; p = 0.897$, Fig 3, right panel) or variability of $PAS_{logquot}$ and electrical peripheral nerve stimulation intensity ($\rho = -0.01; p = 0.139$) and TMS intensity ($\rho = 0.04; p = 0.689$). There was also no significant association between $PAS_{logquot}$ and gender ($r = 0.01; p = 0.851$), the use of neuronavigation ($r = 0.01$;

Table 3. PAS effect over time. Results from rmANOVA over all studies (measurements at baseline, post0 and post15). Bold letters indicate significant effects.

Study	Term	F (df)	P	responder rate
All studies	TIME	0.44 (2;362)	0.644	53.2% (101/190)
All studies	STUDY	2.04 (1; 181)	0.044	
All studies	TIME x STUDY	1.77 (16;362)	0.034	

doi:10.1371/journal.pone.0154880.t003

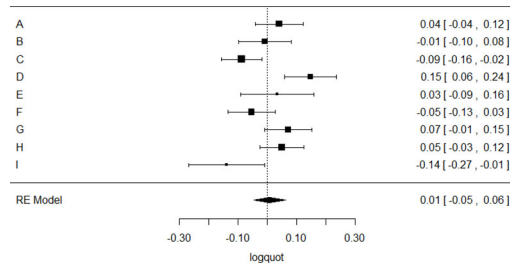


Fig 1. Forest plot of PAS-effect calculated with the logarithmized MEP ratio between the averaged post measurements and baseline ($PAS_{logquot}$). The right column lists the corresponding mean and 95% confidence interval for the individual studies, below the estimated effect across all studies is indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0154880.g001

$p = 0.923$) or the inter-trial interval during the PAS intervention (5 s vs. 20 s; $r = 0.09$; $p = 0.239$).

The left panel of Fig 4 displays the PAS effect relative to baseline with means and SEM calculated across all studies indicating relatively high MEP values and a strong effect of outliers. In contrast, data in the right panel were log-transformed before calculating the means and SEM.

The influence of different methods to estimate the average PAS response was further assessed by comparing the mean of the raw data to the median and the back-transformed mean of the logarithmized data. The mean yielded the highest values in 17 out of 19 cases (Fig 5).

Discussion

Integrating original data from almost 200 subjects, we did not observe a significant effect of PAS (i.e. TIME) but found that the PAS effect differed significantly between studies. However, post-hoc testing did not reveal differences between individual studies after correction for multiple comparisons. The wide range of responder rates together with the differences of the PAS effect between studies argue for a high variability. The results of our study are therefore different from a recent quantitative review showing robust PAS effects across all examined post PAS intervals [6]. Although that study did not access original data from individual subjects, they integrated data from 60 individual studies and made an effort to ensure that results of their meta-analyses were not driven by a number of small scale studies that would report unrealistically large effect-sizes.

Our data were acquired at three sites by two TMS research groups. Although both teams were working independently from each other at the time of data acquisition, we cannot fully

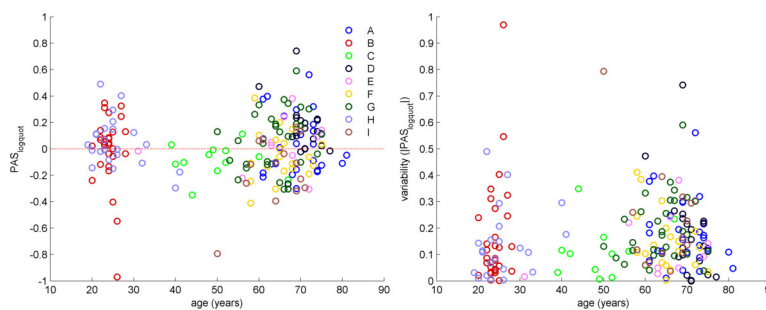


Fig 2. Association between $PAS_{logquot}$ (left panel), variability induced by $PAS_{logquot}$ ($|PAS_{logquot}|$, right panel) and age. Letters indicate separate studies (see Table 1).

doi:10.1371/journal.pone.0154880.g002

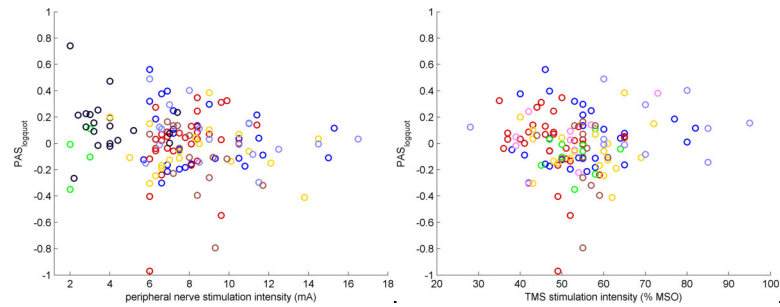


Fig 3. Scatter plot displaying the association between $PAS_{logquot}$ and the intensities of peripheral nerve stimulation (left panel) and TMS (right panel). MSO: maximum stimulator output.

doi:10.1371/journal.pone.0154880.g003

exclude the possibility that both teams performed the PAS intervention incorrectly. However, well powered single studies by other research groups with ample experience in neurophysiology [8,9] also found no evidence for a robust PAS effect, and overall low responder rates.

In line with previous findings [8], we found no association between age and the strength of the PAS effect. In contrast to that study, we did not find a smaller but a higher variability of the MEP after PAS with increasing age. Of note, we did not examine a continuous sample across the whole age range and especially middle aged subjects (i.e. 30–50 years old) are underrepresented in the study sample. Between-study differences could therefore influence age effects. There was also no correlation between the strength of the PAS effect and gender, in line with recent work [34]. In additional correlation analyses we examined the effect of the strength of the electrical and magnetic stimulation on the PAS effect and found no significant correlation, in contrast to [8] who reported stronger PAS effects in those requiring a lower stimulator strength to induce a 1 mV MEP.

We were unable to evaluate the effect of different TMS vendors which had recently been suggested [35] as all studies used the same system. In addition, we did not find a systematic difference between studies with and without a navigation system, findings which add to an ongoing and so far inconclusive debate [20–22].

Importantly, we were able to demonstrate in this meta-analysis that the choice of statistical analysis has a distinct impact on the results: MEPs are not normally distributed and, furthermore, are by definition positive, implying that outliers systematically lead to an overestimation

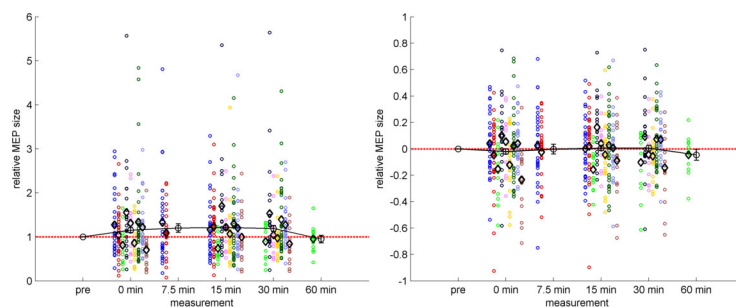


Fig 4. PAS-induced effects. Mean MEP amplitudes following PAS are shown relative to the baseline level. Each study is represented by a distinct color as in Figs 2 and 3, each circle represents the measurements of one subject, and each black diamond marker represents the mean of a study at the given time-point. The black line with error bars represents the temporal course of PAS across subjects and studies. The dashed red line represents no change against the baseline measurement. Left panel: normalized data \pm SEM. Right panel: same PAS data but log-transformed prior to calculation of means and SEM. Note that the x-axis depicts distinct time points rather than a continuous scale.

doi:10.1371/journal.pone.0154880.g004

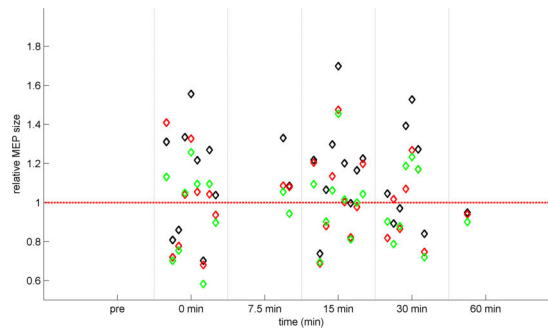


Fig 5. Comparison of methods to calculate the average PAS response. Each column of diamond markers represents the different averages of one study: the mean (black), the median (red), and the mean as calculated on the log-transformed data that was back-transformed to linear space (green). The mean values are systematically higher than those of the median or those of the mean calculated on the log-transformed data.

doi:10.1371/journal.pone.0154880.g005

of the mean (e.g. single MEP measurements can be above 3 mV, but never below 0 mV). This effect is further magnified when parametric statistics are applied to MEP values relative to a baseline measurement as the baseline measurement takes place directly after adjusting stimulation parameters and coil position to acquire stable MEPs with low variability. Small movements or fluctuations of attention may thus have a higher impact on the subsequent post-measurements. Even if there is no external gold standard to validate the statistical method, the positive skewness of the data leads us to propose to log-transform the post/baseline quotient for further statistical processing as this leads to a more normal data distribution and to use absolute MEP values (baseline- and post-measurements) for a rmANOVA. Although not the focus of this study, the same arguments can also be applied to data from individual trials for a given subject and time point where either mean or median can be used to average across trials and data may already be log-transformed at this stage.

In summary, we demonstrate a high variability of the PAS-protocol leading to an overall non-significant effect of the intervention. Given this high variability, PAS-results in neurological and psychiatric patients should be interpreted with precaution. Conclusions drawn from single subject experiments do not yet seem to be reliable, and studies with higher patient numbers are needed to prove the validity of this paradigm in a clinical context. Detailed description of acquisition parameters, blinding the subject and the examiner to group status and even stimulation protocol (e.g. by involving a second experimenter who switches between excitatory 25 ms and inhibitory 10 ms intervals), carefully controlling for potential confounders such as age, gender, attention and a statistical analysis plan robust against outliers seem the best approach to handle PAS data. Moreover, future should investigate further sources of intra- and intersubject variability as it may have a tractable physiological underpinning. A recent approach to track down the high variability of noninvasive brain stimulation paradigms is using brain-state dependent TMS stimulation and thus adjusting the timing of TMS stimulation by real-time analysis of EEG [36,37]. Brain-state dependent variability of PAS may not only explain discrepancies between PAS studies, but also a high intrasubject variability of PAS [38].

Supporting Information

S1 Fig. Forest plot of PAS-effect calculated with the MEP ratio between the averaged post measurements and baseline (PAS_{quot}). The right column lists the corresponding mean and 95% confidence interval for the individual studies, below the estimated effect across all studies

is indicated.
(TIF)

S2 Fig. Forest plot of PAS-effect calculated with the MEP difference between the averaged post measurements and baseline (PAS_{diff}). The right column lists the corresponding mean and 95% confidence interval for the individual studies, below the estimated effect across all studies is indicated.
(TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Miles Wischnewski for helpful additional comments on his study. The article processing charge was funded by the German Research Foundation (DFG) and the Albert Ludwigs University Freiburg in the funding programme Open Access Publishing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: J. Lahr AF SK J. List. Performed the experiments: J. Lahr SP AF J. List. Analyzed the data: J. Lahr J. List SP AF WV. Wrote the paper: J. Lahr SP J. List WV AF SK.

References

1. Cooke SF, Bliss TVP. Plasticity in the human central nervous system. *Brain*. 2006; 129: 1659–1673. doi: [10.1093/brain/awl082](https://doi.org/10.1093/brain/awl082) PMID: [16672292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672292/)
2. Rioult-Pedotti M-S, Friedman D, Donoghue JP. Learning-Induced LTP in Neocortex. *Science*. 2000; 290: 533–536. doi: [10.1126/science.290.5491.533](https://doi.org/10.1126/science.290.5491.533) PMID: [11039938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11039938/)
3. Chen WR, Lee S, Kato K, Spencer DD, Shepherd GM, Williamson A. Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 8011–8015. PMID: [8755594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8755594/)
4. Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, Benecke R, Classen J. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain*. 2000; 123: 572–584. doi: [10.1093/brain/123.3.572](https://doi.org/10.1093/brain/123.3.572) PMID: [10686179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10686179/)
5. Wolters A, Schmidt A, Schramm A, Zeller D, Naumann M, Kunesch E, et al. Timing-dependent plasticity in human primary somatosensory cortex. *J Physiol*. 2005; 565: 1039–1052. doi: [10.1113/jphysiol.2005.084954](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.084954) PMID: [15845584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845584/)
6. Wischnewski M, Schutter DJLG. Efficacy and time course of paired associative stimulation in cortical plasticity: Implications for neuropsychiatry. *Clin Neurophysiol*. 2015; doi: [10.1016/j.clinph.2015.04.072](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.04.072)
7. Stefan K, Kunesch E, Benecke R, Cohen LG, Classen J. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol*. 2002; 543: 699–708. doi: [10.1113/jphysiol.2002.023317](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.023317) PMID: [12205201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12205201/)
8. Müller-Dahlhaus J, Orekhov Y, Liu Y, Ziemann U. Interindividual variability and age-dependency of motor cortical plasticity induced by paired associative stimulation. *Exp Brain Res*. 2008; 187: 467–475. doi: [10.1007/s00221-008-1319-7](https://doi.org/10.1007/s00221-008-1319-7) PMID: [18320180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18320180/)
9. López-Alonso V, Cheeran B, Río-Rodríguez D, Fernández-del-Olmo M. Inter-individual Variability in Response to Non-invasive Brain Stimulation Paradigms. *Brain Stimulat*. 2014; doi: [10.1016/j.brs.2014.02.004](https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.02.004)
10. Ziemann U, Siebner HR. Inter-subject and Inter-session Variability of Plasticity Induction by Non-invasive Brain Stimulation: Boon or Bane? *Brain Stimulat*. 2015; 8: 662–663. doi: [10.1016/j.brs.2015.01.409](https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.01.409)
11. Hordacre B, Ridding MC, Goldsworthy MR. Response variability to non-invasive brain stimulation protocols. *Clin Neurophysiol*. 2015; doi: [10.1016/j.clinph.2015.04.052](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.04.052)
12. Battaglia F, Wang H-Y, Ghilardi MF, Gashi E, Quartarone A, Friedman E, et al. Cortical Plasticity in Alzheimer's Disease in Humans and Rodents. *Biol Psychiatry*. 2007; 62: 1405–1412. doi: [10.1016/j.biopsych.2007.02.027](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.02.027) PMID: [17651702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17651702/)

13. Terranova C, Sant'Angelo A, Morgante F, Rizzo V, Allegra R, Arena MG, et al. Impairment of sensory-motor plasticity in mild Alzheimer's disease. *Brain Stimulat.* 2013; 6: 62–66. doi: [10.1016/j.brs.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.brs.2012.01.010)
14. Player MJ, Taylor JL, Weickert CS, Alonzo A, Sachdev P, Martin D, et al. Neuroplasticity in Depressed Individuals Compared with Healthy Controls. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38: 2101–2108. doi: [10.1038/npp.2013.126](https://doi.org/10.1038/npp.2013.126) PMID: [23676792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23676792/)
15. Frantseva MV, Fitzgerald PB, Chen R, Möller B, Daigle M, Daskalakis ZJ. Evidence for Impaired Long-Term Potentiation in Schizophrenia and Its Relationship to Motor Skill Learning. *Cereb Cortex.* 2008; 18: 990–996. doi: [10.1093/cercor/bhm151](https://doi.org/10.1093/cercor/bhm151) PMID: [17855721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17855721/)
16. Quartarone A, Bagnato S, Rizzo V, Siebner HR, Dattola V, Scalfari A, et al. Abnormal associative plasticity of the human motor cortex in writer's cramp. *Brain J Neurol.* 2003; 126: 2586–2596. doi: [10.1093/brain/awg273](https://doi.org/10.1093/brain/awg273)
17. Sale MV, Ridding MC, Nordstrom MA. Cortisol Inhibits Neuroplasticity Induction in Human Motor Cortex. *J Neurosci.* 2008; 28: 8285–8293. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1963-08.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1963-08.2008) PMID: [18701691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18701691/)
18. Stefan K, Wycislo M, Classen J. Modulation of Associative Human Motor Cortical Plasticity by Attention. *J Neurophysiol.* 2004; 92: 66–72. doi: [10.1152/jn.00383.2003](https://doi.org/10.1152/jn.00383.2003) PMID: [14724259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14724259/)
19. Hamada M, Murase N, Hasan A, Balaratnam M, Rothwell JC. The Role of Interneuron Networks in Driving Human Motor Cortical Plasticity. *Cereb Cortex.* 2013; 23: 1593–1605. doi: [10.1093/cercor/bhs147](https://doi.org/10.1093/cercor/bhs147) PMID: [22661405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661405/)
20. Julkunen P, Säisänen L, Danner N, Niskanen E, Hukkanen T, Mervaala E, et al. Comparison of navigated and non-navigated transcranial magnetic stimulation for motor cortex mapping, motor threshold and motor evoked potentials. *NeuroImage.* 2009; 44: 790–795. doi: [10.1016/j.neuroimage.2008.09.040](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.09.040) PMID: [18976714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18976714/)
21. Jung NH, Delvendahl I, Kuhnke NG, Hauschke D, Stolle S, Mall V. Navigated transcranial magnetic stimulation does not decrease the variability of motor-evoked potentials. *Brain Stimulat.* 2010; 3: 87–94. doi: [10.1016/j.brs.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.brs.2009.10.003)
22. Bashir S, Edwards D, Pascual-Leone A. Neuronavigation increases the physiologic and behavioral effects of low-frequency rTMS of primary motor cortex in healthy subjects. *Brain Topogr.* 2011; 24: 54–64. doi: [10.1007/s10548-010-0165-7](https://doi.org/10.1007/s10548-010-0165-7) PMID: [21076861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21076861/)
23. Di Lazzaro V, Oliviero A, Pilato F, Saturno E, Insola A, Mazzone P, et al. Descending volleys evoked by transcranial magnetic stimulation of the brain in conscious humans: effects of coil shape. *Clin Neurophysiol.* 2002; 113: 114–119. doi: [10.1016/S1388-2457\(01\)00696-4](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(01)00696-4) PMID: [11801432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11801432/)
24. List J, Duning T, Meinzer M, Kürten J, Schirmacher A, Deppe M, et al. Enhanced Rapid-Onset Cortical Plasticity in CADASIL as a Possible Mechanism of Preserved Cognition. *Cereb Cortex.* 2011; 21: 2774–2787. doi: [10.1093/cercor/bhr071](https://doi.org/10.1093/cercor/bhr071) PMID: [21531778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21531778/)
25. List J, Albers J, Kürten J, Schwindt A, Wilbers E, Flöel A. Reperfusion Does Not Improve Impaired Rapid-Onset Cortical Plasticity in Patients with Severe Stenosis of the Internal Carotid Artery. *PLoS ONE.* 2012; 7: e41004. doi: [10.1371/journal.pone.0041004](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041004) PMID: [22844423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22844423/)
26. List J, Duning T, Kürten J, Deppe M, Wilbers E, Flöel A. Cortical plasticity is preserved in nondemented older individuals with severe ischemic small vessel disease. *Hum Brain Mapp.* 2013; 34: 1464–1476. doi: [10.1002/hbm.22003](https://doi.org/10.1002/hbm.22003) PMID: [22331645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22331645/)
27. List J, Kübke JC, Lindenberg R, Külzow N, Kerti L, Witte V, et al. Relationship between excitability, plasticity and thickness of the motor cortex in older adults. *NeuroImage.* 2013; 83: 809–816. doi: [10.1016/j.neuroimage.2013.07.033](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.07.033) PMID: [23876242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23876242/)
28. List J, Hertel-Zens S, Kübke JC, Lesemann A, Schreiber SJ, Flöel A. Cortical Reorganization Due to Impaired Cerebral Autoregulation in Individuals With Occlusive Processes of the Internal Carotid Artery. *Brain Stimulat.* 2014; 7: 381–387. doi: [10.1016/j.brs.2014.02.006](https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.02.006)
29. Klöppel S, Lauer E, Peter J, Minkova L, Nissen C, Normann CM, et al. LTP-like plasticity in the visual system and in the motor system appear related in young and healthy subjects. *Front Hum Neurosci.* 2015; 9: 506. doi: [10.3389/fnhum.2015.00506](https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00506) PMID: [26441603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26441603/)
30. Lahr J, Peter J, Minkova L, Lauer E, Reis J, Heimbach B, et al. No difference in paired associative stimulation induced cortical neuroplasticity between patients with mild cognitive impairment and elderly controls. *Clin Neurophysiol.* 2015;0. doi: [10.1016/j.clinph.2015.08.010](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.08.010)
31. Wiethoff S, Hamada M, Rothwell JC. Variability in Response to Transcranial Direct Current Stimulation of the Motor Cortex. *Brain Stimulat.* 2014; 7: 468–475. doi: [10.1016/j.brs.2014.02.003](https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.02.003)
32. Dwan K, Altman DG, Arnaiz JA, Bloom J, Chan A-W, Cronin E, et al. Systematic Review of the Empirical Evidence of Study Publication Bias and Outcome Reporting Bias. *PLoS ONE.* 2008; 3: e3081. doi: [10.1371/journal.pone.0003081](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003081) PMID: [18769481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18769481/)

33. Viechtbauer W. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *J Stat Softw.* 2010; 36: 1–48.
34. Strube W, Bunse T, Malchow B, Hasan A, Strube W, Bunse T, et al. Efficacy and Interindividual Variability in Motor-Cortex Plasticity following Anodal tDCS and Paired-Associative Stimulation, Efficacy and Interindividual Variability in Motor-Cortex Plasticity following Anodal tDCS and Paired-Associative Stimulation. *Neural Plast Neural Plast.* 2015;2015, 2015: e530423. doi: [10.1155/2015/530423](https://doi.org/10.1155/2015/530423)
35. Nieminen JO, Koponen LM, Ilmoniemi RJ. Experimental Characterization of the Electric Field Distribution Induced by TMS Devices. *Brain Stimulat.* 2015; 8: 582–589. doi: [10.1016/j.brs.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.01.004)
36. Gharabaghi A, Kraus D, Leão MT, Spüler M, Walter A, Bogdan M, et al. Coupling brain-machine interfaces with cortical stimulation for brain-state dependent stimulation: enhancing motor cortex excitability for neurorehabilitation. *Front Hum Neurosci.* 2014; 8: 122. doi: [10.3389/fnhum.2014.00122](https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00122) PMID: [24634650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24634650/)
37. Sergeeva EG, Henrich-Noack P, Bola M, Sabel BA. Brain-state-dependent non-invasive brain stimulation and functional priming: a hypothesis. *Front Hum Neurosci.* 2014; 8: 899. doi: [10.3389/fnhum.2014.00899](https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00899) PMID: [25414662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25414662/)
38. Fratello F, Veniero D, Curcio G, Ferrara M, Marzano C, Moroni F, et al. Modulation of corticospinal excitability by paired associative stimulation: Reproducibility of effects and intraindividual reliability. *Clin Neurophysiol.* 2006; 117: 2667–2674. doi: [10.1016/j.clinph.2006.07.315](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.07.315) PMID: [17011821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17011821/)

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalartikel:

Paßmann S, Külzow N, Ladenbauer J, Antonenko D, Grittner U, Tamm S, Flöel A. Boosting slow oscillatory activity using tDCS during early nocturnal slow wave sleep does not improve consolidation in healthy older adults. *Brain Stimulation*, 2016.

Ladenbauer J, Külzow N, **Paßmann S**, Antonenko D, Grittner U, Tamm S, Flöel A. Brain Stimulation during an afternoon nap boosts slow oscillatory activity and memory consolidation in older adults. *NeuroImage*, 2016.

Lahr J*, **Paßmann S***, List J, Vach W, Flöel A, Klöppel S. Effects of different analysis strategies on paired associative stimulation. A pooled data analysis from three research labs. *PLOS ONE* 11(5): e0154880.

Michael L, **Paßmann S**, Becker R. Electrodermal lability as an indicator for subjective sleepiness during total sleep deprivation. *J Sleep Res* 2011; 21(4):470-8.

Poster:

Külzow N, **Paßmann S**, Tamm S, Flöel A. Association of sleep parameters and memory-related ERP OLD/NEW effects in a picture recognition task in younger and older adults. Poster auf der 42. Psychologie und Gehirn, Berlin 2016.

Ladenbauer J, Külzow N, **Paßmann S**, Antonenko D, Grittner U, Tamm S, Flöel A. Brain stimulation during an afternoon nap boosts slow oscillatory activity and memory consolidation in older adults. Alzheimer's Association International Conference, Washington D.C. 2015.

Paßmann S, Külzow N, Tamm S, Flöel A. How does noninvasive brain stimulation during nocturnal slow wave sleep effect EEG-activity and performance in a visual memory task in healthy older adults? Poster auf der 41. Psychologie und Gehirn, Frankfurt 2015.

Paßmann S, Külzow N, Flöel A. Effects of noninvasive brain stimulation during slow wave sleep on visual memory in younger and older adults. Poster auf der 40. Psychologie und Gehirn, Lübeck 2014 und Summerschool „Memory and Consciousness“, Tübingen 2014.

Paßmann S, Michael L, Wallisch P. Hautleitfähigkeitsreaktionen bei der Bewertung von Filmtiteln. Poster auf der 51. Tagung experimentell arbeitender Psychologen, Jena 2009.

Thesis:

Paßmann S. Beiträge zur Pollenmorphologie der Subtribus Maxillariinae (Orchidaceae).
Magisterabschlußarbeit, Friedrich Schiller University Jena 2003

Danksagung

Zum Ende hin möchte ich Dank all jenen sagen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zu allererst Frau Prof. Dr. Agnes Flöel, welche mir in ihrer Arbeitsgruppe die Möglichkeit gab und mich dabei in allen Belangen wunderbar unterstützte, ein Thema zu bearbeiten, welches sich im Laufe der Zeit zu einem für mich zentralen Interessensgebiet entwickelte und ich weiterhin auf dem Gebiet der Forschung verfolgen werde. Des Weiteren Frau Dr. Nadine Külzow, welche mich auf eine unglaublich engagierte Art in allen Phasen der Dissertation begleitete – sei es durch den inhaltlichen Input oder ihren Einsatz für mich, damit ich mich voll auf das Gelingen dieser Studie konzentrieren konnte. Aber auch auf aufgrund ihrer herzlichen und menschlichen Art, was sie für mich zur idealen Betreuerin machte.

Ebenfalls Dank sagen möchte ich all meinen Kollegen (allen voran Skadi Wilke, Benedikt Taud, Torsten Rackoll, Theresa Köbe, Robert Darkow), für dieses fantastische Zusammengehörigkeitsgefühl. Die mir aber auch stets das Gefühl gaben, in allen Belangen akzeptiert und geachtet zu werden. Insbesondere möchte ich noch Frau Julia Ladenbauer danken, die mir aufgrund der Besonderheit der Studien 1 und 2 als Partnerin ebenfalls viel Hilfestellung auf theoretischer Seite geben konnte und die mir als Kollegin sehr ans Herz gewachsen ist.

Weiterhin danken möchte auch meinen Eltern, die mit ihrer Erziehung und ihrer Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Diese Arbeit ist vorrangig ihnen gewidmet, da ich darüber wenigstens einen Teil dessen zurückgeben kann, was sie für mich taten.

Danke sage ich auch drei besonderen Menschen in meinen Leben: Dr. Michael Gommel, welcher mir in unermüdlicher Weise die Wichtigkeit wissenschaftlicher Ethik und wissenschaftlich korrekten Verhaltens aufzeigte und mich darin schulte, der aber auch mit seiner jahrelangen Erfahrung in Publikationsfragen mir eine unglaublich große Hilfe war. Dr. Henry Ludwig, der als einer meiner ältesten Freunde, stets ein offenes Ohr hatte und mir, wann immer nötig, eine Auszeit in meiner alten Universitätsstadt ermöglichte. Zahlreiche Diskussionen mit ihm über Wissenschaftsgebiete hinweg zeigten mir dabei neue Perspektiven und ich konnte gestärkt und mit neuem Tatendrang wieder ans Werk gehen. Und zu guter Letzt meinem Lebenspartner Tino Lieske, der als Fels in der Brandung stets für die Erdung sorgte. Der mich aber auch auf seine ganz eigene, unnachahmliche Art und Weise unterstützt und begleitet, bei allem was ich mache, wofür ich ihn über alles liebe.

